

**Mannich-Basen aus [b]-anellierten Indolen als potentielle Inhibitoren der
Proteinkinase DYRK1A**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Christian Lechner
aus Helmstedt

1. Referent:	Prof. Dr. Conrad Kunick
2. Referent:	Prof. Dr. Hermann Wätzig
eingereicht am:	08.04.2019
mündliche Prüfung (Disputation) am:	27.06.2019

Druckjahr:	2019
------------	------

Vorveröffentlichenden der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Lechner, C.; Kunick, C.: Inhibitors of the CMGC proteine kinase superfamily as antiparasitic agents (Poster). COST Action CM1307 – Targeted chemotherapy towards diseases caused by endoparasites, Training School “Antiparasitic drug design and screening *in silico*”, Sienna (Italien), 19.05. – 22.05.2017.

Lechner, C.; Fläßhoff, M.; Falke, H.; Preu, L.; Meijer, L.; Knapp, S.; Chaikuad, A.; Meine, R.; Kunick, C.: [b]-Annulated halogen-substituted indoles as potential DYRK1A inhibitors (Poster). DPhG Jahrestagung, Hamburg, 02.10. – 05.10.2018.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2016 bis Januar 2019 am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,

dem ich für die Überlassung des spannenden Themas, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die sehr schöne Zeit im Arbeitskreis von Herzen danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Professor Dr. Hermann Wätzig

für die Übernahme des Koreferats.

In Liebe meinem Großvater Olaf gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Alzheimer-Demenz und Down-Syndrom.....	1
1.3 Proteinkinase DYRK1A	3
1.3.1 Struktureller Aufbau der Proteinkinase DYRK1A.....	3
1.3.2 Physiologische Bedeutung DYRK1A	6
1.3.3 DYRK1A-Inhibitoren.....	8
1.3.4 Mit DYRK1A verwandte Proteinkinasen	15
1.4 Halogenbindungen	18
1.5 Physikochemische Eigenschaften in der Wirkstoffentwicklung	22
1.5.1 Permeabilität und Wasserlöslichkeit	22
1.5.2 Anzahl aromatischer Ringe und Fsp ³ -Verhältnis	24
1.5.3 LogP, logD und Schmelzpunkt	25
1.5.4 LE und LLE	25
1.6 Aufgabenstellung	27
2 Wirkstoffdesign.....	31
2.1 Molekulares <i>docking</i>	31
2.2 Bindemodi von DYRK1A-Inhibitoren.....	32
2.2.1 Bindemodus von Harmin	32
2.2.2 Bindemodus von XMD7-117.....	33
2.2.3 Bindemodus von 10-Iod-11 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>c</i>]chinolin-6-carbonsäure	34
2.2.4 Bindemodus von 4-Chlorcyclohepta[<i>b</i>]indol-10(5 <i>H</i>)-on.....	36
2.3 <i>Redocking</i> -Experimente	37
2.4 Bindemodi entworfener Wirkstoffkandidaten	39
2.4.1 Bindemodus von 8-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4 <i>H</i> -carbazol-4-on (21)	40

2.4.2	Bindemodi von Mannich-Basen des 8-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4 <i>H</i> -carbazol-4-ons	41
2.4.3	Bindemodi von Mannich-Basen des 6-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4 <i>H</i> -carbazol-4-ons	46
2.4.4	Ausgewählte Bindemodi von Mannich-Basen des 1,2,3,9-Tetrahydro-4 <i>H</i> -carbazol-4-ons	50
2.4.5	Bindemodus von 6-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4 <i>H</i> -carbazol-4-on	51
2.4.6	Bindemodi der 3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4 <i>H</i> -carbazol-4-one	52
2.4.7	Bindemodus von 2-(4-Oxo-2,3,4,9-tetrahydro-1 <i>H</i> -carbazol-3-yl)acetonitril	55
2.4.8	Docking in die verwandte Proteinkinase CLK1	56
2.5	Schlussfolgerungen.....	58
2.6	Exkurs <i>homology modelling</i>	58
3	Synthese	60
3.1	Synthese von 6/8-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4 <i>H</i> -carbazol-4-on	60
3.2	Synthese der Mannich-Basen aus 1,2,3,9-Tetrahydro-4 <i>H</i> -carbazol-4-onen	62
3.2.1	Syntheseversuche.....	62
3.2.2	Synthese der Mannich-Basen aus 3-Methylencarbazol-4-onen	67
3.2.3	Synthese von 2-(4-Oxo-2,3,4,9-tetrahydro-1 <i>H</i> -carbazol-3-yl)acetonitril	69
3.3	Analytische Besonderheiten der Mannich-Base 27a	70
3.3.1	Massenspektrometrische Untersuchungen.....	70
3.3.2	NMR-Spektroskopische Untersuchungen.....	72
4	Biologische Aktivität	76
4.1	Allgemeines Vorgehen zur Bestimmung der Hemmaktivitäten	76
4.2	Kinaseinhibitorische Aktivität [<i>b</i>]-anellierter Indole als Leitstrukturen	77
4.3	Kinaseinhibitorische Aktivität der 3-Methylencarbazol-4-one	78
4.4	Kinaseinhibitorische Aktivität von Carbazol-4-on-Mannich-Basen	80
4.5	Schlussfolgerungen.....	82
5	Physikochemische Eigenschaften	84
5.1	Löslichkeit	87
5.1.1	Kinetische und thermodynamische Löslichkeit	90

5.1.2	Interpretation der ermittelten Löslichkeit.....	92
6	Zusammenfassung.....	104
7	Summary.....	106
8	Experimenteller Teil	108
8.1	Geräte und Methoden	108
8.2	Synthese und analytische Daten	113
8.3	Molekulares <i>docking</i>	144
8.4	Proteinkinaseassays	144
8.5	Vorhergesagte physikochemische Eigenschaften	148
8.6	Löslichkeit	148
8.6.1	Kinetische Löslichkeit	148
8.6.2	Thermodynamische Löslichkeit	149
9	Verzeichnisse.....	151
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	151
9.2	Formelverzeichnis	154
9.3	Schemataverzeichnis	154
9.4	Tabellenverzeichnis	155
10	Literaturverzeichnis	156

Abkürzungsverzeichnis

[M] ^{•+}	Molekülradikalkation
[M+H] ⁺	Protoniertes Molekülkation
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ACN	Acetonitril
AD	Alzheimer Demenz
ADME	<i>absorption, distribution, metabolism und excretion</i>
ADP	Adenosindiphosphat
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
APP	Amyloid-Precursor-Protein
aq.	wässrige Lösung
Ar	Anzahl aromatischer Ringsysteme
Ar-H	aromatisches Wasserstoffatom
ASAP	<i>Atmospheric solids analysis probe</i>
ASF	<i>alternative splicing factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Absorbance unit</i>
AUC	<i>area under the curve</i>
A β	β -Amyloid
BACE1/2	<i>β-site APP cleaving enzyme 1 und 2</i>
BCS	<i>Biopharmaceutical Classification System</i>
ber.	berechnet
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Caco	<i>Caucasian colon adenocarcinoma</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CK	<i>casein kinase</i>
CLK	<i>CDK-like kinase</i>
clogP	vorhergesagter Verteilungskoeffizient
COST	<i>Coopération européenne dans le domaine de la recherche scientifique et technique</i>
cS	vorhergesagte Löslichkeit in μ M
CSNK1D	casein kinase 1 delta
d	Dublett
DAD	<i>diode array detector</i>
DANDYs	<i>diaryl-azaindole inhibitors of DYRK1A</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett von Dubletts
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon
DEPT	<i>distorsionless enhancement by polarization transfer</i>
DFG	Asparaginsäure(D)-Phenylalanin(F)-Glycin(G)
DH-box	dyrk homology box
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	deuteriertes DMSO

DOPE	<i>Discrete Optimized Protein Energy</i>
DREAM-Komplex	<i>dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulval class B</i>
DS	Down Syndrom
DSCR	<i>Down syndrome critical region</i>
DYRK	<i>dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase</i>
EA	Elementaranalyse
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EGCG	Epigallocatechin-Gallat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	<i>Electron Spray Ionization</i>
FASTA	<i>fast all</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FDANDYs	<i>fluorinated diaryl-azaindole inhibitors of DYRK1A</i>
FINDY	<i>folding inhibitor of dyrk</i>
Fsp ³ -Verhältnis	sp ³ -hybridisierte Kohlenstoffe im Verhältnis zum Gesamtkohlenstoff
FT-IR	Fourier Transformation-Infrarotspektroskopie
FWHM	<i>full width at half maximum height</i>
GA	Genetischer Algorithmus
gef.	gefunden
gk	<i>gatekeeper</i>
GOLD	<i>Genetic optimisation for ligand docking</i>
GSK	<i>glycogen synthase kinase</i>
HA	Alle Atome außer Wasserstoff (<i>heavy atoms</i>)
HA/HD	Verhältnis zwischen H-Brückenakzeptoren und -donatoren
Hal	Halogen
HCl	Chlorwasserstoff
HEK293	<i>human embryonic kidney-293-Zellen</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HTS	<i>high throughput screening</i>
HxD-Region	Histidin-X-Asparaginsäure-Region
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
<i>in silico</i>	computergestützt
INDY	<i>inhibitor of dyrk</i>
isokr.	isokratisch
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IWB	Intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung
J	Kopplungskonstante
kLys	konserviertes Lysin
LE	<i>ligand efficiency</i>
<i>Lin</i>	<i>Leishmania infantum</i>
LLE	<i>lipophilic ligand efficiency</i>
m	Multipllett
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
MAO-A	Monoaminoxidase A

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MeOH	Methanol
MIRK	<i>minibrain related kinase</i>
mnb	<i>minibrain</i>
MOE	<i>Molecular Operating Enviroment</i>
Mr	relative Molmasse
MRD7	<i>mental retardation autosomal dominant 7 Syndrom</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NFB	neurofibrilläre Bündel
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
NMDA	<i>N-Methyl-D-aspartat</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NTU	<i>relative nephelometric turbidity unit</i>
PAINS	<i>pan assay interference compounds</i>
PAMPA	<i>Parallel artificial membran permeability assay</i>
PDB	<i>Protein data bank</i>
PEST	Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T)
PFK	Perfluorkerosin
PIM1	<i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase Pim-1</i>
ppm	<i>parts per million</i>
RB	Rotierbare Bindungen
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RO5	<i>rule of five</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
SIRT1	Sirtuin1
SP	Senile Plaques
S _Y	Löslichkeit nach Yalkowsky
t	Triplett
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TS65Dn	<i>Ts65Dn mouse model of Down syndrome</i>
unspez.	unspezifisch
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factors</i>
Zers.	Zersetzung
ΔpH	pH-Wert Änderung
λ _{max}	Absorptionsmaximum

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Proteinkinase DYRK1A spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei den Pathomechanismen der Alzheimer-Demenz und des Down-Syndroms ein. Um die Beteiligung der Kinase an den Prozessen auf zellulärer Ebene zu untersuchen, werden potente und selektive DYRK1A-Inhibitoren benötigt. Bei der Entwicklung von Hemmstoffen, die auch als Therapeutika in Frage kommen könnten, müssen von Beginn an neben der Selektivität auch physikochemische Aspekte berücksichtigt werden. Wird diesen Eigenschaften nicht genügend Beachtung gewidmet, scheitern Entwicklungskandidaten oft in späteren Phasen, beispielsweise an unzureichender Löslichkeit und mangelnder Bioverfügbarkeit.

1.2 Alzheimer-Demenz und Down-Syndrom

Weltweit sind etwa 50 Millionen Menschen an der häufigsten Demenzform^[1], der Alzheimer-Demenz (AD), erkrankt. Schätzungen prognostizieren eine Verdreifachung der gegenwärtigen Prävalenz bis 2050.^[2] Dies liegt vor allem am steigenden Durchschnittsalter der Weltbevölkerung.^[3] Neben einem hohen Alter gibt es weitere Risikofaktoren für Demenz wie Kopfverletzungen, Depressionen, Bluthochdruck, Diabetes oder Adipositas.^[4] Die Symptome einer AD sind vielfältig. Neben dem progredienten Verlust des Kurzzeitgedächtnisses werden Sprachschwierigkeiten, Orientierungslosigkeit, Stimmungsschwankungen, Motivationslosigkeit und mangelnde Eigenversorgung als Symptome der AD beschrieben.^{[4],[5]} Gekennzeichnet ist die Erkrankung durch einen Verlust von Neuronen und Synapsen im Bereich der Großhirnrinde.^[6] Als Ursache für diesen Untergang von Zellen innerhalb der Großhirnrinde werden extrazelluläre senile Plaques (SP) diskutiert, die vor allem aus Ablagerungen von aggregierten β -Amyloid-Proteinen bestehen. β -Amyloide bilden sich bei der Spaltung des membranständigen Amyloid-Precursor-Proteins (APP) durch β - und γ -Sekretasen. Die APP-Spaltprodukte werden in gesunden Individuen extrazellulär schnell abgebaut. In Individuen mit AD akkumulieren diese Peptide und lösen den Untergang von Neuronen aus.^[7] Weiterhin werden sogenannte neurofibrilläre Bündel (NFB) im Zusammenhang mit dem Pathomechanismus der AD beschrieben. Die NFB bestehen aus selbstaggregierten *tau*-Proteinen, die sich im Zellinneren ansammeln.^[3] Das *tau*-Protein beeinflusst die am Cytoskelett beteiligten Mikrotubuli und ist daher unter anderem an der Zellkommunikation beteiligt.^[8]

Therapiestrategien zielen vor allem auf das cholinerge System ab, da in der Vergangenheit ein Acetylcholin-Defizit für die Ausbildung der AD verantwortlich gemacht wurde.^[9] Hierbei handelt es sich um eine symptomatische Behandlung der Erkrankung. Bisher sind vier

Wirkstoffe zur Behandlung der AD von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen.^[10] Das am weitesten verbreitete Antidementivum ist Donepezil.^[11] Es gehört wie Rivastigmin und Galantamin zu den Acetylcholinesterase-Inhibitoren.^[12] Glutamaterge Rezeptoren wie der *N*-Methyl-D-aspartat Rezeptor (NMDA-Rezeptor) stellen ebenfalls ein Target für die symptomatische Behandlung dar. Als nichtkompetitiver Antagonist wird dabei in der Therapie Memantin verwendet. Dieser wirkt dem NMDA-vermittelten neuronalen Zelltod entgegen.^[13] Andere Therapiestrategien stellen hingegen eine kausale Therapie in den Vordergrund. β -Sekretase-Inhibitoren wie Verubecestat oder Lanabecestat verhindern durch Hemmung der β -site APP *cleaving enzyme* 1 und 2 (BACE1, BACE2) die Bildung toxischer β -Amyloide. Beide Wirkstoff-Kandidaten werden aktuell in Phase III-Studien evaluiert.^{[4],[14],[15]}

Inhibition der Hyperphosphorylierung des *tau*-Proteins ist ebenfalls ein interessanter Therapieansatz, bei dem Proteinkinasen und Phosphatasen als Targets im Vordergrund stehen. In einer Phase II Studie wurde der *glycogen synthase kinase* (GSK)-3 β -Inhibitor Tideglusib, der zum einen die *tau*-Phosphorylierung und zum anderen den kontrollierten Zelltod reduziert, getestet, konnte bisher aber keine klinischen Erfolge verzeichnen.^{[16],[17]}

Das Down-Syndrom (DS) umfasst eine Kombination aus geistigen und körperlichen Beeinträchtigungen. Statistisch tritt es bei einer von ca. 700 Geburten auf.^[18] Als Risikofaktoren gelten ein hohes Alter sowie endogene (bspw. genetisch) und exogene (z. B. Strahlung, Alkoholkonsum) Faktoren.^[19] Genotypisch liegt eine sogenannte Aneuploidie des Chromosoms 21 vor, wobei Individuen mit DS drei Kopien dieses Chromosoms (Trisomie) aufweisen. In wenigen Fällen können auch einige Körperzellen mit einem euploidischen Chromosom 21 im Körper vorkommen (Mosaik-Trisomie, Prävalenz 1–5%). Auch einzelne Teile des Chromosoms können dreifach im Genom vorkommen. Dieses Phänomen wird partielle Trisomie genannt.^[20] Auf Chromosom 21 sind vor allem Proteine codiert, die an der Ausbildung des Cytoskeletts, an der Signaltransduktion und an der Transkription beteiligt sind.^[18] Daher werden neben den morphologischen Veränderungen überwiegend geistige Beeinträchtigungen festgestellt. Nahezu jedes Individuum mit DS entwickelt früher oder später eine AD. Da das APP-Gen auf Chromosom 21 lokalisiert ist und somit beim DS 1.5fach vorliegt, ist es nicht verwunderlich, dass die AD bereits ab einem Alter von ca. 30 Jahren bei Individuen mit DS auftreten kann.^[21] Für die Pharmakotherapie der AD beim DS eignet sich nur eine symptomatische Behandlungen, wobei auf die oben beschriebenen Therapeutika zurückgegriffen wird. Eine kausale Therapie des DS steht bisher nicht zur Verfügung und würde sich außerdem als äußerst schwierig darstellen, da sie bereits ab einem frühen Schwangerschaftszeitpunkt erfolgen müsste. Ein möglicher Angriffspunkt für eine kausale Therapie von AD und DS könnten Proteinkinasen sein.

1.3 Proteinkinase DYRK1A

Die Zulassung des ersten oral bioverfügbaren Proteinkinase-Inhibitors Imitanib im Jahr 2001 war der Startschuss für die Entwicklung vieler weiterer zugelassener Proteinkinase-Inhibitoren.^[22] Durch Transfer des γ -Phosphatrestes von Adenosintriphosphat (ATP) auf Serin-, Threonin- und Tyrosin-Seitenketten von Substratproteinen spielen Proteinkinasen eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion.^[23] Aus diesem Grund sind viele Proteinkinasen an elementaren Zellmechanismen beteiligt.^[24] Die *dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase* 1A (DYRK1A) weist Substratspezifität für Serin und Threonin auf und ist unter anderem an Prozessen wie der Apoptose ^{[25],[26]}, der Zellzyklusregulation ^{[27]–[29]}, der Transkription ^[30], dem Spleißen ^[31] und synaptischen Prozessen ^[32] beteiligt. DYRK1A ist eine von 518 menschlichen Proteinkinasen und gehört der DYRK-Familie an.^[33] Die DYRK-Familie befindet sich innerhalb der CMGC-Gruppe, zu der außerdem *cyclin-dependent kinases* (CDKs), *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), *glycogen synthase kinases* (GSKs) und *CDK-like kinases* (CLKs) gehören.^[34] Alle Mitglieder der CMGC-Gruppe binden ATP in ihrer katalytischen Domäne. Innerhalb der DYRK-Familie können zwei Klassen unterschieden werden. Der Klasse I werden die strukturell sehr ähnlichen Proteinkinasen DYRK1A und DYRK1B zugeteilt. In Klasse II werden DYRK2, DYRK3 und DYRK4 einsortiert. DYRK1A wurde im Vergleich zu allen anderen Mitgliedern der Familie bislang deutlich ausführlicher charakterisiert.^{[35],[36]}

1.3.1 Struktureller Aufbau der Proteinkinase DYRK1A

Strukturell weisen alle Proteinkinasen zwei verschiedene Domänen auf. Diese tragen spezifisch zur Kontrolle der Katalyseaktivität und Regulierung der Proteinkinase bei. Die N-terminale Domäne besteht überwiegend aus β -Faltblättern und die C-terminale Domäne aus α -Helices.^[37] Beide Domänen werden durch die *hinge*-Region miteinander verknüpft, in deren Bereich sich die ATP-Bindetasche befindet. Die *hinge*-Region der DYRK1A besteht aus den Aminosäuren Glu239, Met240 und Leu241. Zur *hinge*-Region bildet ATP über das Adenin-Strukturelement zwei Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) aus.^{[38],[39]} Unmittelbar vor der *hinge*-Region befindet sich der sogenannte *gatekeeper* (gk) Phe238. Dieser verhindert durch seine Größe den Zugang zu einer hydrophoben Bindetasche im hinteren Bereich der ATP-Bindetasche.^[40] Durch diesen Verschluss wird eine Reihe von Wechselwirkungsmöglichkeiten blockiert. Das konservierte DFG-Motiv (Asparaginsäure(D)-Phenylalanin(F)-Glycin(G)-Motiv) innerhalb der *activation-loop* kann bei Proteinkinasen in zwei unterschiedlichen Konformationen auftreten. In der *DFG-out* Konformation (inaktive Form) kann beispielsweise eine zusätzliche allosterische Bindetasche von einem Inhibitor adressiert werden, die in der *DFG-in* Konformation (aktive Form) nicht zur Verfügung steht.^[41]

Typ-I-Inhibitoren hemmen die aktive Form und Typ-II-Inhibitoren die inaktive Form einer Proteinkinase. Im Zustand der DFG-*in* Konformation koordiniert die Asparaginsäure des DFG-Motivs zwei Magnesium-Ionen, welche auch mit den Phosphatresten des ATPs interagieren.^[41] Neben dem konservierten DFG-Motiv kommen weitere konservierte Bereiche innerhalb der DYRK1A vor. So zeigen das konservierte Lys188 und die konservierte Glu203 ebenfalls Wechselwirkungen mit ATP.^[42] Die konservierte HxD-Region (Histidin-X-Asparaginsäure-Region) ist ebenfalls an der katalytischen Aktivität beteiligt und beinhaltet bei DYRK1A die hochkonservierten Aminosäuren Asp166 (D), Cys167 (C) und His168 (H).^[43] Jedes Mitglied der DYRK-Familie weist weitere charakteristische Familienmerkmale auf. Die sogenannte *DYRK-homology box* (DH-Box) erstreckt sich über einen Bereich von 25 Aminosäuren in der N-terminalen Domäne und kommt bei allen Familienmitgliedern vor. Bisher wurde keine Funktion dieses Bereichs nachgewiesen.^[44]

Fünf Hauptregionen der DYRK1A können beschrieben werden. Das *nuclear localisation signal* (NLS) befindet sich am Ende der N-terminalen Domäne, das für die Delokalisation von DYRK1A ins Zellkerninnere sorgt, um dort beispielsweise das Spleißen zu regulieren. Die Kinase-Domäne bindet ATP und ist der Ort der katalytischen Prozesse. Die PEST-Region ist reich an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T). Auch eine Region, die reich an Serin und Threonin ist, wurde gefunden. Aufeinander folgende Histidin-Einheiten kennzeichnen die letzte der fünf Hauptregionen.^[45] Zur Aktivierung von DYRK1A muss eine Phosphorylierung an einem konservierten Tyrosin (Tyr321) vollzogen werden.^[46] Bereits während der Translation findet daher eine Autophosphorylierung an Tyr321 statt.^[36] Das phosphorylierte Tyr321 (pTyr321) wird durch eine Salzbrücke mit Arg325 und Arg328 stabilisiert.^[47] Nach abgeschlossener Translation ist DYRK1A auch nach Dephosphorylierung von Tyr321 weiterhin aktiv.^[48] DYRK1A ist durch die Spezifität für Serin und Threonin, die sich in Nähe von kleinen hydrophoben Aminosäuren befinden, charakterisiert.^[36] Des Weiteren weist DYRK1A, wie alle Mitglieder der CMGC-Gruppe, einen CMGC *insert* am C-terminalen Ende auf.^[49] Alle charakteristischen Merkmale und Regionen sind in Abbildung 1-1 und Abbildung 1-2 dargestellt.

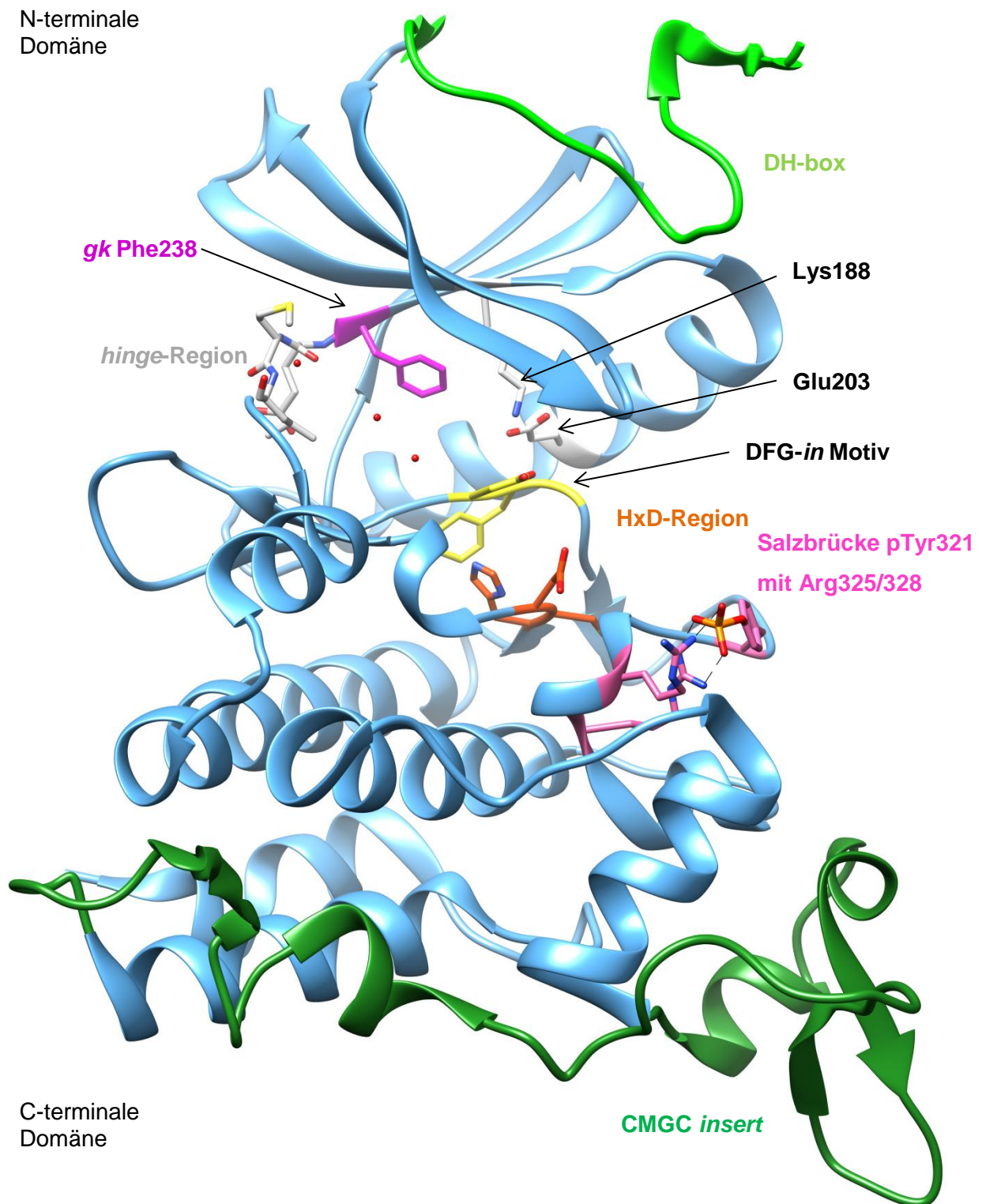


Abbildung 1-1: Co-Kristallstruktur der Proteinkinase DYRK1A mit Bezeichnung charakteristischer Merkmale (PDB:4YLJ^[50]). Der co-kristallisierte Inhibitor wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

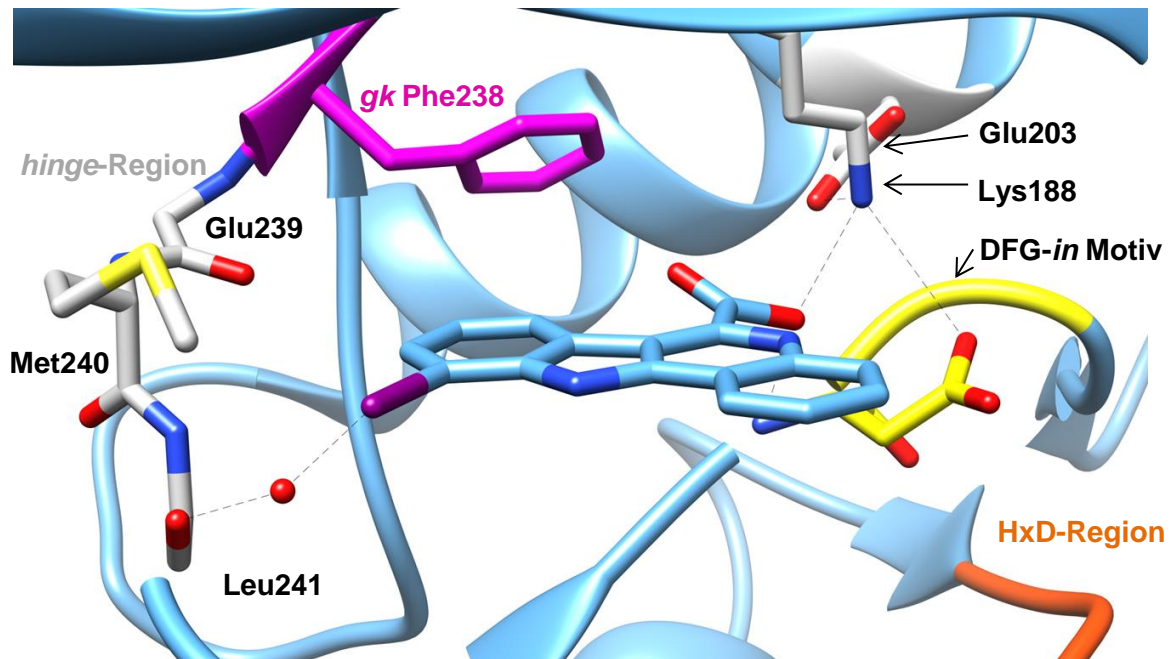


Abbildung 1-2: Nahansicht der katalytischen Domäne von DYRK1A mit dem Liganden 10-Iod-11H-indol[3,2-c]chinolin-6-carbonsäure (PDB:4YLJ^[50]). Der Ligand geht Wechselwirkungen zur hinge-Region, zum konservierten Lys188 und dem DFG-in Motiv ein.

1.3.2 Physiologische Bedeutung DYRK1A

Eines der ersten identifizierten Substrate innerhalb der DYRK1A-Signaltransduktion war der *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT). DYRK1A phosphoryliert die aktive Form dieses Transkriptionsfaktors, wodurch dieser inaktiviert wird und anschließend in das Cytosol zurückwandert.^[51] Aufgrund dieses Vorganges wird seit kurzem eine DYRK1A-Inhibition zur Therapie für Diabetes Typ I und II diskutiert. Als Transkriptionsfaktor ist NFAT in der Lage, durch Proliferationsprozesse die Zahl der β -Zellen und damit die Insulinsekretion zu erhöhen.^{[52]–[54]} DYRK1A bewirkt indirekt, dass Zellen den Zellzyklus verlassen und in die G_0 -Phase übertreten. Damit verbunden ist die Differenzierung, die durch das Protein p27^{Kip1} bewirkt wird, einem Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen.^[55] Außerdem wurde eine Beteiligung von DYRK1A an der Bildung des DREAM-Komplexes (*dimerization partner*, RB-like, E2F and multi-vulval class B), der bei der Zellzyklusregulation beteiligt ist, gezeigt. Durch DYRK1A-vermittelte Phosphorylierung wird die Bildung dieses Komplexes ermöglicht und damit ein Austritt aus dem Zellzyklus forciert.^[56] Der Notch-Signalweg wird ebenfalls durch DYRK1A inhibiert. Der Notch-Signalweg sorgt durch Zell-Zell-Kommunikation zum Aufrechterhalten eines determinierten Stammzellenpools.^[57] Zur korrekten Ausführung dieser Signalwege ist daher eine Balance der DYRK1A-Expression und Aktivität zur Erhaltung des Normalstatus notwendig.^[58]

Der organisierte Zelltod wird durch die Caspase-9, ein Substrat der DYRK1A, vorangetrieben. Die Phosphorylierung der Caspase-9 durch DYRK1A an Thr125 hemmt die Apoptose.^[59] Sirtuin 1 (SIRT1), ein weiteres Substrat der DYRK1A, wirkt durch Deacetylierung des „Wächter des Genoms“ p53 hemmend auf die Apoptose.^[60]

Außerdem fungiert DYRK1A als *priming*-Kinase für die Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3). Die Phosphorylierung eines Substrates durch GSK-3 findet nur nach vorheriger Phosphorylierung durch andere Proteinkinasen statt. Neben NFAT wird auch das *tau*-Protein als Substrat dieses *priming*-Prozesses beschrieben.^[61] Durch Hyperphosphorylierung des *tau*-Proteins durch DYRK1A wird die Selbstaggregation von *tau* verstärkt.^[62]

Während des Spleißens werden in der DNA enthaltende Introns entfernt, sodass nur noch Exons zurückbleiben. Dieser Prozess kann für die Diversität von Proteinen wichtige Alternativrouten eröffnen, wodurch mehrere Versionen eines Proteins möglich werden.^[58] So resultieren zwei unterschiedliche *tau*-Varianten durch alternatives Spleißen. Normalerweise treten die beiden Varianten 3R-*tau* und 4R-*tau* innerhalb der Zelle im Gleichgewicht auf. Durch Phosphorylierung des *alternative splicing factors* (ASF) und anderen Spleißfaktoren durch DYRK1A entsteht ein Ungleichgewicht zwischen 3R- und 4R-*tau*, was ebenfalls verantwortlich für das Entstehen einer AD gemacht wird.^[58]

Zusätzlich ist eine Verknüpfung von DYRK1A mit der Tumorgenese möglich. Hierbei werden jedoch widersprüchliche Rollen diskutiert. In DS-Mäusen (Ts65Dn Mäuse) zeigte DYRK1A tumor-suppressive Eigenschaften.^[58] Auch die deaktivierende Wirkung auf NFAT und die Hemmung der Calcineurin-vermittelten Produktion des *vascular endothelial growth factors* (VEGF) kann mit dieser Theorie in Einklang gebracht werden.^[63] Die Wirkung von DYRK1A als Onkogen hingegen wird durch die Stabilisierung des *epidermal growth factor* Rezeptors (EGFR) über eine Inhibition von Sprouty2 belegt. Sprouty2 sorgt für den Abbau von EGFR und somit zu einer geringeren Proliferation der Zelle.^{[64],[65]} Die bereits beschriebene Hemmung der Apoptose führt zu einem Überleben von fehlerhaften Zellen, die sich zu einem Tumor weiterentwickeln können. Bei Megakaryoblastenleukämie und Glioblastom nimmt DYRK1A eine fördernde Rolle ein.^{[66],[67]}

Das Gen für DYRK1A ist das einzige Mitglied der DYRK-Familie, das auf Chromosom 21 der sogenannten *Down syndrome critical region* (DSCR) lokalisiert ist.^[45] Bei Individuen mit DS tritt das Gen für DYRK1A somit 1.5fach auf. DS-Gehirne weisen daher einen erhöhten Spiegel von DYRK1A auf.^[68] Durch den DYRK1A-vermittelten Austritt aus dem Zellzyklus wird die Zellproliferation stark erniedrigt. So weisen Föten von DS Individuen nahezu keine Proliferation von Zellen innerhalb des Hippocampus auf.^[69] Daher wird DYRK1A als Zielstruktur für eine kausale Therapie des DS in Betracht gezogen.^[70] DYRK1A phosphoryliert unter anderem Presenilin 1, das Bestandteil des γ -Sekretase-Komplexes ist, und führt damit zu einer vermehrten Spaltung durch γ -Sekretasen und schließlich zu mehr β -Amyloid Proteinen.^[71]

Lange Zeit fehlte eine Verknüpfung zwischen der APP- und *tau*-Problematik, die schließlich 2007 von KIMURA *et al.* postuliert wurde. Danach induziert das β -Amyloid-Protein eine Erhöhung der DYRK1A-Expression und damit eine Verstärkung der *tau*-Protein- und APP-vermittelten Effekte.^[72]

Aufgrund der 1.5fachen Konzentration von DYRK1A bei Individuen mit DS werden überwiegend Effekte, die bei DYRK1A-Überexpression auftreten, diskutiert. Kürzlich zeigte sich jedoch, dass ein haploides Auftreten der Proteinkinase zum *mental retardation autosomal dominant 7* Syndrom (MRD7) führt. Kennzeichnend für MRD7 sind u.a. geistige Beeinträchtigungen, Krampfanfälle und Autismus. Individuen mit MRD7 weisen einen diploiden Chromosomensatz auf. Eine Kopie des Gens für DYRK1A wird jedoch fehlerhaft exprimiert oder fehlt vollkommen. Dies führt zu einer fehlerhaften Faltung des Proteins und damit zum Verlust der katalytischen Aktivität.^[73]

1.3.3 DYRK1A-Inhibitoren

Die Inhibition der Proteinkinase DYRK1A ist wissenschaftlich interessant, da sie an essentiellen Prozessen und Signalwegen beteiligt ist. Um diese Signalwege zu untersuchen sind chemische Sonden notwendig, die selektiv und potent sind. Die Entwicklung von Enzyminhibitoren als potentielle Therapeutika ist herausfordernd, weil kleinste Abweichungen von der physiologischen Normalsituation zu schwerwiegenden Problemen innerhalb der Zelle führen können. Deswegen ist eine passgenaue und selektive Inhibition zur Beeinflussung der DYRK1A-vermittelten Effekte nötig. Für chemische Sonden wird von einer selektiven Inhibition gesprochen, wenn mindestens eine 30fach höhere Inhibition im Vergleich zu verwandten Proteinen vorliegt. In diesem Zusammenhang sollte die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) unterhalb von 100 nM liegen.^[74] Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) sollte in zellulären Versuchen unter 1 μ M liegen.^[75] Für Wirkstoffkandidaten ist des Weiteren eine *off-Target* Analyse wichtig um toxische Effekte und unerwünschte Wirkungen zu minimieren.^[76] Der Einsatz von Multi-Target-Inhibitoren ist jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen. So zeigten DAVIS *et al.* in ihrer Analyse der Kinaseselektivität auf, dass es durchaus zugelassene Wirkstoffe gibt, die mehrere Zielstrukturen adressieren.^[77]

Viele DYRK1A-Inhibitoren, die in der Literatur beschrieben werden, haben einen natürlichen Ursprung.^[78] In jüngerer Vergangenheit wurden auch synthetisch hergestellte Produkte mit DYRK1A-inhibitorischer Aktivität beschrieben. Eine Aufstellung von DYRK1A-Inhibitoren wird von einigen Übersichtsartikeln gezeigt.^{[70],[79]–[81]}

Harmin (**1**) (Abbildung 1-3), ein β -Carbolin, zeigt eine starke Hemmwirkung auf DYRK1A ($IC_{50} = 33 \text{ nM}$) und weitere Familienmitglieder wie DYRK1B ($IC_{50} = 160 \text{ nM}$), DYRK2 ($IC_{50} = 1.9 \text{ }\mu\text{M}$), DYRK3 ($IC_{50} = 900 \text{ nM}$) und DYRK4 ($IC_{50} = 80 \text{ }\mu\text{M}$).^{[82],[83]} Allerdings weist **1** auch eine hohe Aktivität an der Monoaminoxidase-A (MAO-A, $IC_{50} = 5 \text{ nM}$) auf und wirkt daher stimulierend auf das zentrale Nervensystem.^[84] Diese Eigenschaft macht es unmöglich, **1** als Arzneistoff in der Therapie einzusetzen, da es unter anderem Angstzustände, Krampfanfälle oder Tremor auslösen kann. In einem Affinitätstest (DiscoverX) mit 468 Proteinkinasen zeigte Harmin zahlreiche Interaktionen.^[85] Obwohl **1** ein schlechtes Selektivitätsprofil aufweist, wird es als Referenzsubstanz zur Bestimmung der Hemmaktivität an der DYRK1A bei *in vitro*-Tests verwendet.^[86] Strukturmodifikationen am Grundgerüst von **1** führten zu Substanzen, die am N^9 -Stickstoffatom substituiert sind. Ein Beispiel dafür ist AnnH75 (**2**) (Abbildung 1-3), das am N^9 -Stickstoffatom einen Acetonitril-Substituenten trägt. Zusätzlich wurde die 1-Position modifiziert. Durch Austausch der Methylgruppe in 1-Position gegen Chlor konnte der DYRK1A/MAO-A-Selektivitätsindex auf >55 gesteigert werden.^[87] Interessanterweise zeigte die Verbindung **3** (Abbildung 1-3)^[85], die ebenfalls einen Chlor-Substituenten in 1-Position trägt, einen sehr niedrigen IC_{50} -Wert ($IC_{50} \text{ DYRK1A} = 8.8 \text{ nM}$). Die Substanz wurde hinsichtlich ihrer MAO-A Hemmaktivität jedoch nicht untersucht.

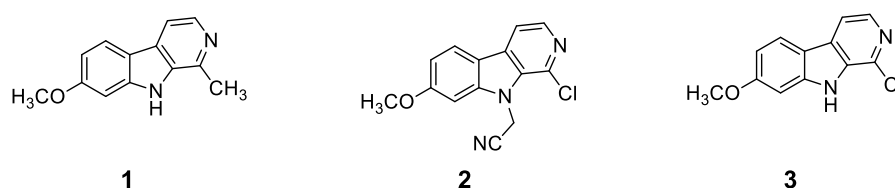


Abbildung 1-3: Strukturen der Inhibitoren Harmin (**1**), AnnH75 (**2**) und Verbindung **3**, die von der Arbeitsgruppe um DE VITA beschrieben wurde.

Wie **1** stellt auch Epigallocatechin-Gallat (**4**, EGCG) (Abbildung 1-4) ein Naturprodukt dar. Es wird aus den Flavanolen des grünen Tees gewonnen.^[88] Bei EGCG handelt es sich, abweichend von den anderen in diesem Kapitel beschriebenen Typ I-Inhibitoren, um einen nicht ATP-kompetitiven Typ II Inhibitor. Seine Hemmaktivität für DYRK1A liegt im submikromolaren Bereich ($IC_{50} = 330 \text{ nM}$).^[89] KIM *et al.* zeigten jedoch auf, dass EGCG mit vielen Proteinen innerhalb der Zelle interagiert.^[90] Polyphenole können als *pan assay interference compounds* (PAINS) aufgefasst werden, die durch unspezifische Interaktionen mit biologischen Zielstrukturen oder innerhalb des Assays oft falsch positive Ergebnisse liefern.^[91] Neben der eingeschränkten Selektivität erweist sich das hohe Metabolisierungspotential als problematisch. Dies wird vor allem auf die metabolisch anfälligen phenolischen OH-Gruppen zurückgeführt.^[92] Nichtsdestotrotz wurde **4** bereits in Tierversuchen und klinischen Studien

eingesetzt. So konnten kognitive Defizite von Trisomie 16-Mäusen durch Behandlung mit **4** verbessert werden.^[93]

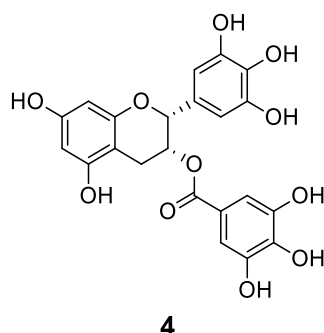


Abbildung 1-4: Struktur des Flavanols ECGC (**4**).

Die Meridianin-Derivate **5** und **6** (Abbildung 1-5) sind Indolalkaloide, deren Grundstruktur ursprünglich aus der Seescheide *Aplidium meridianum* isoliert wurde. Bereits seit einigen Jahren ist bekannt, dass Meridianine Proteinkinasen, wie CDK1-5 und GSK-3 α/β , hemmen.^[94] Verbindung **5** zeigte eine submikromolare Hemmaktivität gegenüber DYRK1A (IC_{50} = 500 nM). In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls ein Selektivitätsprofil in Bezug auf andere Mitglieder der DYRK-Familie erstellt. Dabei wurden DYRK2 (IC_{50} = 1.4 μ M) und DYRK3 (IC_{50} = 2.2 μ M) berücksichtigt und evaluiert.^[95] SHAW *et al.* gelang es durch Synthese des korrespondierenden 6-Azaindoles eine zusätzliche Wechselwirkung mit dem konservierten Lys188 zu generieren und somit die Hemmaktivität drastisch zu erhöhen (IC_{50} DYRK1A = 1 nM). Die guten *in vitro* Testergebnisse konnten durch zelluläre Untersuchungen bislang nicht bestätigt werden.^[96]

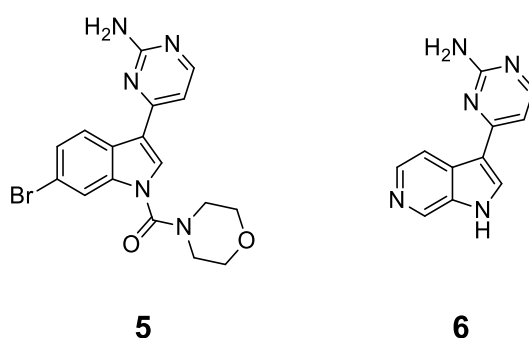


Abbildung 1-5: Struktur der Meridianin-Derivate **5** und **6**.

Leucettamin B (**7**) (Abbildung 1-6) ist ein natürliches Alkaloid, das aus dem marinen Schwamm *Leucetta microraphis* isoliert wurde. Es zeigte Aktivität an Mitgliedern der DYRK- und CLK-

Familie. Daher wurden verschiedene Derivate ausgehend vom Naturstoff **7** synthetisiert. Leucettine L41 (**8**) wurde als dualer DYRK1A-/CLK1-Inhibitor beschrieben, der einen ähnlichen IC_{50} -Wert wie Harmin aufweist (IC_{50} DYRK1A = 40 nM, C_{50} DYRK2 = 35 nM und IC_{50} CLK1 = 15 nM). Der neuroprotektive Effekt von Verbindung **8** in Tiermodellen der AD wird anhand des Selektivitätsprofils mit einem kooperativen Effekt der verschiedenen Interaktionspartner (z. B. CLK1, DYRK1A/B oder GSK-3 α/β) erklärt.^{[78],[97],[98]}

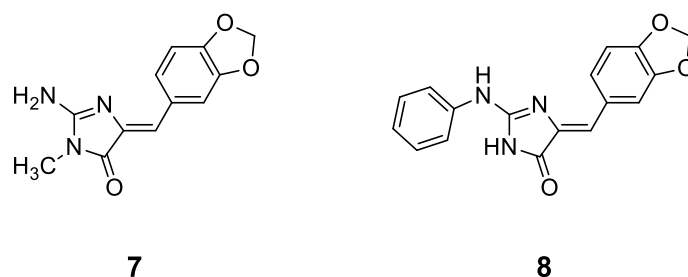


Abbildung 1-6: Struktur der Leucettamine **7** und **8**.

Ausgehend von TC003 (**9**) (Abbildung 1-7), einem bereits bekannten CLK1/CLK4 Inhibitor (IC_{50} CLK1 = 20 nM, IC_{50} CLK4 = 15 nM), wurde der *inhibitor of dyrk* (**10**, INDY) (Abbildung 1-7) entwickelt. **10** zeigt eine Aktivität an DYRK1A (IC_{50} = 240 nM) und an DYRK1B (IC_{50} = 230 nM). Hemmaktivitäten bei einer Konzentration von 10 μ M von mehr als 90% wurden für CLK1, CLK4, DYRK2, DYRK3, casein kinase 1 (CSNK1D) und PIM1 festgestellt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde INDY als dualer CLK/DYRK-Inhibitor eingeordnet. Eine MAO-A-Inhibition konnte nicht festgestellt werden. In Testungen an Embryos von *Xenopus laevis* (Apothekerfrosch oder Krallenfrosch) zeigte proINDY (**11**) (Abbildung 1-7), ein Prodrug von INDY, einen positiven Effekt auf die Hirnentwicklung nach DYRK1A mRNA-Injektion.^{[99],[100]}

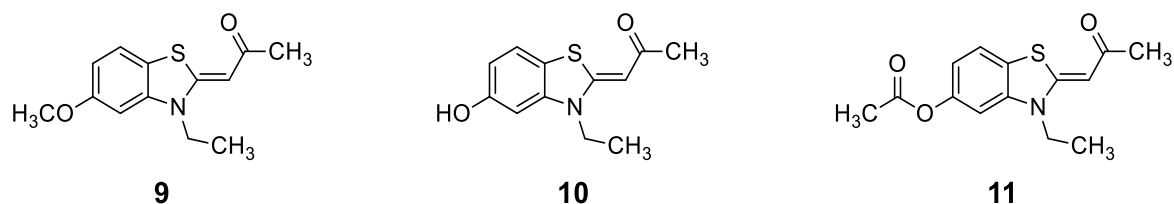


Abbildung 1-7: Struktur der Benzothiazole TC003 (**9**), INDY (**10**) und proINDY (**11**).

Die bisher aktivsten DYRK1A-Inhibitoren wurden von der Arbeitsgruppe um FOUCORT *et al.* beschrieben. Die Methyl-9-anilinothiazolo[5,4-*f*]chinazolin-2-carbamidate EHT 1610 (**12**) und EHT 5372 (**13**) (Abbildung 1-8) zeigten eine subnanomolare Aktivität an DYRK1A und DYRK1B. Die Selektivität gegenüber nahverwandten Proteinkinasen ist vielversprechend. So zeigte **12** eine 30fach höhere Aktivität an DYRK1A und **13** sogar eine 100fach höhere Aktivität gegenüber CLK1. Die Arbeitsgruppe ordnete die Derivate **12** und **13** daher als duale DYRK1A/1B-Inhibitoren ein. In zellulären Versuchen mit **12** und **13** konnte eine Verringerung der *tau*-Hyperphosphorylierung sowohl direkt als auch indirekt (durch A β -Induktion) festgestellt werden.

Aufgrund der Beteiligung von DYRK1B an der Entstehung gewisser Tumorarten könnten diese Derivate ebenfalls für dieses Einsatzgebiet in Frage kommen.^{[101],[102]}

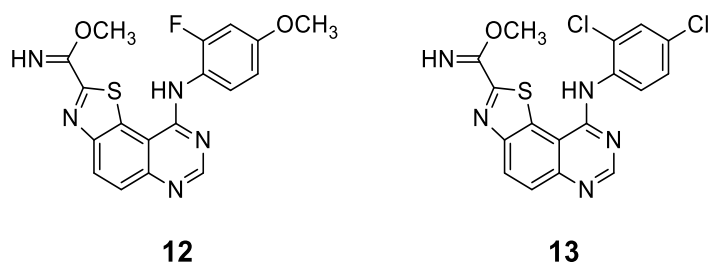


Abbildung 1-8: Struktur der bisher potentesten DYRK1A-Inhibitoren EHT 1610 (**12**) und EHT 5372 (**13**).

Die *diaryl-azaindole inhibitors of DYRK1A* (DANDYs) zeigten ebenfalls eine niedrige nanomolare Inhibition der DYRK1A. 3-(4-Hydroxyphenyl)-5-(3,4-dihydroxyphenyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin (**14**) (Abbildung 1-9) lieferte als potenteste Verbindung einen IC₅₀-Wert von 3 nM. GOURDAIN *et al.* variierten die Substitution der beiden Phenyl-Bestandteile und zeigten dabei, dass sich eine Hydroxy-Funktion gegenüber einer Methoxy-Funktion als vorteilhaft erwies, da mehr Interaktionen mit der Protein-Oberfläche ausgebildet werden konnten. Die Selektivität wurde mit Faktor ~2 gegenüber DYRK2 und DYRK3 angegeben.^[103] Basierend auf den DANDYs wurden FDANDYs entwickelt, die sich durch eine Fluor-Substitution auszeichnen. Diese Abwandlung sollte im Vergleich zu den DANDYs zu einer besseren Passage durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) führen. Hemmstoff **15** (Abbildung 1-9) stellte sich als potenter Inhibitor (IC₅₀ DYRK1A = 20.7 nM) mit geringerer Zytotoxizität heraus. DS-Mäuse zeigten unter der Behandlung mit **15** deutliche Verbesserungen der kognitiven Fähigkeiten. Weil **15** die BHS überwinden kann, wird ein therapeutischer Einsatz beim DS diskutiert.^[104]

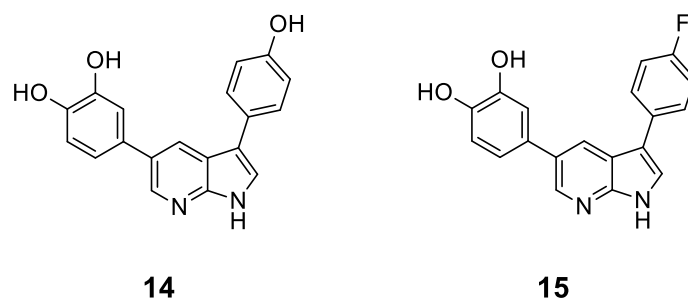


Abbildung 1-9: Struktur von DANDY **14** und FDANDY **15**.

CX_4945 (**16**) (Abbildung 1-10) ist ein Inhibitor der *casein kinase 2* (CK2). Die Substanz zeigte in klinischen Studien (Phase I und II) einen positiven Effekt bei Leukämie und wird daher als mögliche Therapie bei hämatologischen Tumoren vorgeschlagen.^[105] Die Arbeitsgruppe um Kim *et al.* wies für **16** ebenfalls eine starke Aktivität an DYRK1A/1B ($IC_{50} = 6.4\text{--}6.8\text{ nM}$) und DYRK3 ($IC_{50} = 18\text{ nM}$) nach. Auch die Hemmaktivität für CLKs liegt in diesem Bereich (IC_{50} 3–10 nM). Die Arbeitsgruppe zeigte außerdem, dass **16** die Hyperphosphorylierung von *tau*-Proteinen und die Desaktivierung von NFAT positiv beeinflusst. In einem Experiment mit *Drosophila melanogaster* (Schwarzbauchige Taufliege), die *mnf* (*minibrain*, ortholog zu DYRK1A) überexprimiert, konnte eine Normalentwicklung mit **16** wiederhergestellt werden.

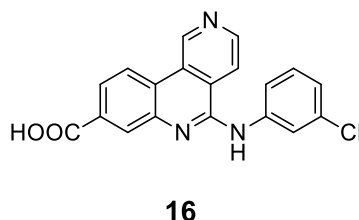
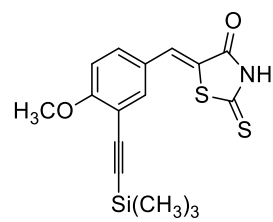


Abbildung 1-10: Struktur von CX_4945 (**16**).

Ein völlig anderer Wirkmechanismus wurde von der Arbeitsgruppe um Kii *et al.* beschrieben. Die Substanz FINDY (**17**, *folding inhibitor of dyrk*) (Abbildung 1-11) hemmt eine Autophosphorylierung an Ser97 während der Translation der DYRK1A. Durch diese Hemmung kann der Faltungsprozess der Proteinkinase nur fehlerhaft ablaufen und die Aktivität der Proteinkinase sinkt. Auch eine allosterische Hemmung und somit die Veränderung der ATP-Bindetasche wurden diskutiert.^[106]



17

Abbildung 1-11: Struktur von FINDY (**17**).

1.3.4 Mit DYRK1A verwandte Proteinkinasen

Auffällig bei der Betrachtung der oben beschriebenen Inhibitoren ist, dass viele dieselben *off*-Target neben DYRK1A inhibieren. Das Design eines selektiven und hochaktiven Inhibitors ist eine große Herausforderung, da die katalytischen Domänen der CMGC-Familie sehr ähnlich aufgebaut sind. Die Aminosäuresequenzen ausgewählter CMGC-Mitglieder wurden daher anhand von FASTA-Sequenzen aus der UniProt-Datenbank mit BLAST verglichen.^{[107],[108]} Auch die ATP-Bindetaschen der einzelnen Proteinkinasen wurden miteinander verglichen.^[109] Ein häufiges *off*-Target der DYRK1A ist die DYRK1B, deren ATP-Bindetaschen sich lediglich in einer Aminosäure unterscheiden (Tabelle 1-1&1-2). Der BLAST-Vergleich beider Protein-Sequenzen ergab, dass 74% aller Aminosäuren in DYRK1A und DYRK1B identisch sind (Tabelle 1-3). DYRK1B wird deswegen auch häufig *minibrain related kinase* (MIRK) genannt und tritt bei Tumorerkrankungen in den Focus.^[110] Neben der Klasse I Proteinkinase DYRK1B wurden auch die Sequenzen und ATP-Bindetaschen für die Klasse II Proteinkinasen DYRK2, DYRK3 und DYRK4 verglichen. DYRK2 ist zu 44% identisch mit DYRK1A (Tabelle 1-3). Die ATP-Bindetasche unterscheidet sich deutlich, da weitaus mehr Aminosäuren an ihrer Ausbildung beteiligt sind (Tabelle 1-1&1-2). Ähnliche Ergebnisse wurden für DYRK3 erzielt (42% identisch, weitaus mehr Aminosäuren in katalytischer Domäne, Tabelle 1-1&1-2 und 1-3). DYRK4 hingegen zeigt eine sehr ähnlich aufgebaute ATP-Bindetasche (Tabelle 1-1&1-2) ist jedoch nur zu 44% identisch mit DYRK1A.

Neben der DYRK-Familie wurden beispielhaft CLK1 (häufiges *off*-Target) und GSK3- β betrachtet. Beide wiesen eine Identität von 30% auf (Tabelle 1-3). Die ATP-Bindetasche beider unterschied sich im Vergleich zur DYRK1A jedoch deutlich (Tabelle 1-1&1-2).

Auffällig ist, dass einzig DYRK1A ein Methionin in der *hinge*-Region aufweist. DYRK2 und DYRK3 unterscheiden sich innerhalb der DYRK-Familie am meisten von DYRK1A. DYRK4 hat ähnlich wie DYRK1B eine hohe Identität mit der ATP-Bindetasche von DYRK1A, weist jedoch am *N*-terminalen und *C*-terminalen Ende größere Unterschiede auf. CLK1 unterscheidet sich u. a. durch ein Leu in der zu 165 in DYRK1A analogen Position. Außerdem sind zusätzliche Aminosäuren an der Bildung der ATP-Bindetasche von CLK1 beteiligt. Viele DYRK1A-Inhibitoren (*vide supra*) inhibieren trotz dieses geringen Unterschiedes in der Oberfläche der ATP-Bindetasche häufig auch CLK1. Die deutlichsten Unterschiede innerhalb der ATP-Bindetaschen zeigten sich bei GSK3- β . Der *gatekeeper* ist in diesem Fall ein Leu und damit deutlich kleiner als Phe238 bei DYRK1A. Die *hinge*-Regionen der beiden Kinasen unterscheiden sich in jeder Position.

Tabelle 1-1: Vergleich der katalytischen Domänen von DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4, CLK1 und GSK3- β . ^a

	165	166	167	168	169	173	186	188	203	+	222	238	239	240	241
DYRK1A	Ile	Gly	Lys	Gly	Ser	Val	Ala	Lys	Glu	-	Val	Phe	Glu	Met	Leu
DYRK1B	Ile	Gly	Lys	Gly	Ser	Val	Ala	Lys	Glu	-	Val	Phe	Glu	Leu	Leu
DYRK2	Ile	Gly	Lys	Gly	Ser	Val	Ala	Lys	Glu	-	Ile	Phe	Glu	Leu	Leu
DYRK3	Ile	Gly	Lys	Gly	Ser	Val	Ala	Lys	Glu	-	Ile	Phe	Glu	Leu	Leu
DYRK4	Ile	Gly	Lys	Gly	Ser	Val	Ala	Lys	Glu	-	Val	Phe	Glu	Leu	Leu
CLK1	Leu	Gly	Glu	Gly	Ala	Val	Ala	Lys	Glu	S	Val	Phe	Glu	Leu	Leu
GSK3-β	Ile	Gly	Asn	Gly	-	Val	Ala	Lys	Glu	-	Val	Leu	Asp	Tyr	Val

^a hellgrau: konserviertes Lys188 und Glu203, rot: zusätzliche Aminosäuren, violett: gatekeeper, dunkelgrau: hinge-Region; Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz von DYRK1A.

Tabelle 1-2: Vergleich der katalytischen Domänen von DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4, CLK1 und GSK3- β . Fortsetzung von Tabelle 1-1. ^a

	244	+	+	287	289	291	292	294	307	+	+	+	+	+	+	+	+
DYRK1A	Asn	-	-	Asp	Lys	Glu	Asn	Leu	Asp	-	-	-	-	-	-	-	-
DYRK1B	Asn	-	-	Asp	Lys	Glu	Asn	Leu	Asp	-	-	-	-	-	-	-	-
DYRK2	Asn	Y	E	Asp	Lys	Glu	Asn	Leu	Asp	S	Y	Y	I	Q	S	F	G
DYRK3	Asn	Y	E	Asp	Lys	Glu	Asn	Leu	Asp	S	Y	Y	I	Q	S	F	G
DYRK4	Asn	-	-	Asp	Lys	Glu	Asn	Val	Asp	-	-	-	-	-	-	-	-
CLK1	Ser	Y	D	Asp	Lys	Glu	Asn	Leu	Asp	S	S	L	V	S	T	H	T
GSK3-β	Thr	-	-	-	Lys	Gln	Asn	Leu	Asp	-	-	-	-	-	-	-	-

^a rot: zusätzliche Aminosäuren, orange: innerhalb des HxD-Motivs, gelb: innerhalb des DFG-Motivs; Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz von DYRK1A.

Tabelle 1-3: Prozentuale Identität der Protein-Sequenzen von DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4, CLK1 und GSK3- β in Bezug auf DYRK1A.

	DYRK1B	DYRK2	DYRK3	DYRK4	CLK1	GSK3- β
%DYRK1A	74%	44%	42%	45%	30%	30%

Die Unterschiede zwischen DYRK1A und CLK1 wurden in einer Superimpositionsanalyse beider ATP-Bindetaschen (Abbildung 1-12) weiter verdeutlicht. Im Bereich der *hinge*-Region hat Met240 bei DYRK1A eine größere Oberfläche als Leu243 bei CLK1. Am Eingang der Bindetasche von DYRK1A befindet sich mit Ile165 eine Aminosäure mit kleinerer Oberfläche als bei CLK1 (Leu167). Dies führt bei der CLK1 zu einem deutlich schmalen Eingang zur ATP-Bindetasche. In Position 167 der DYRK1A wird dieser Effekt ebenfalls beobachtet. CLK1 weist an dieser Position eine Glu169, DYRK1A hingegen ein Lys167 auf. An Position 247 trägt CLK1 ein Ser, DYRK1A jedoch ein Asn. Diese geringen Unterschiede in der Oberflächenstruktur beider Proteine können durch selektive Inhibitoren durch hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen adressiert werden. Im Vorfeld können diese Unterschiede durch *in silico* Experimente evaluiert werden. Bisher gelang es noch nicht, eine Co-Kristallstruktur von DYRK1B zu erzeugen, sodass eine Superimposition der ATP-Bindetaschen von DYRK1A und DYRK1B bisher nur mit Homologie-Modellen möglich ist. Diese Homologie-Modelle basieren jedoch häufig auf DYRK1A, da sich beide Proteinkinasen sehr ähnlich sind. Aus diesem Grund sind beide Oberflächenstrukturen an vielen Stellen kaum zu unterscheiden.

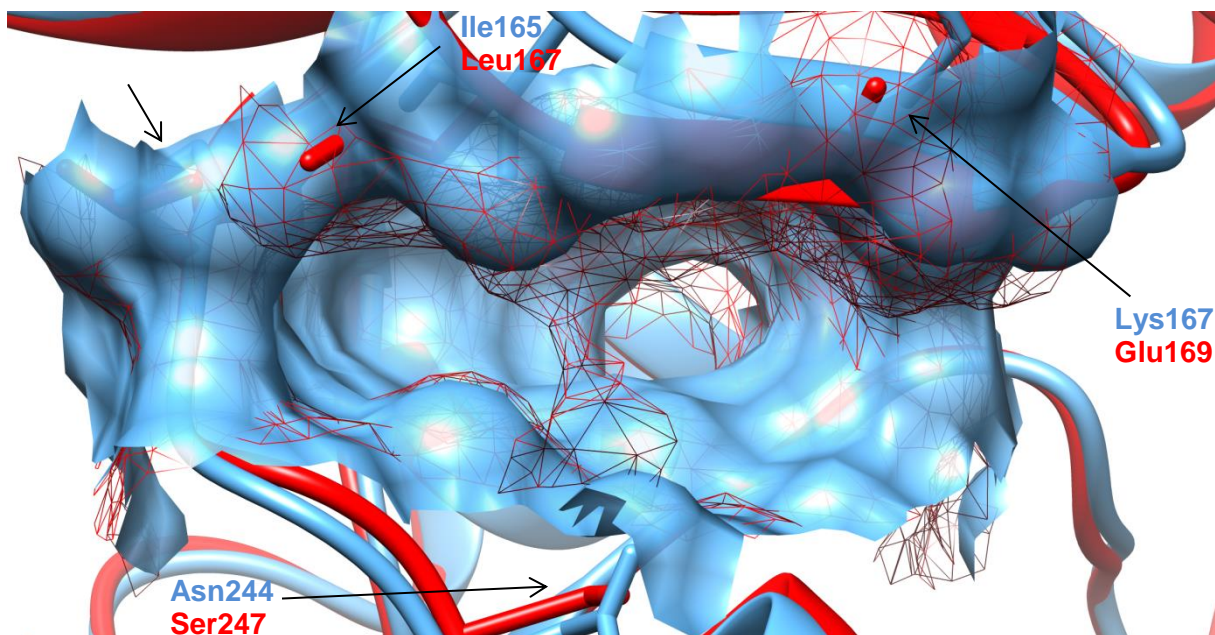


Abbildung 1-12: Vergleich der Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche von DYRK1A (hellblau, PDB:4YLJ ^[50], feste Oberfläche) und CLK1 (rot, PDB:1Z57 ^[111], netzartige Oberfläche) durch Superimposition.

1.4 Halogenbindungen

Bereits im Jahr 1814 konnte eine nicht-kovalente Bindung zwischen Iod und Ammoniak festgestellt werden.^[112] Zu diesem Zeitpunkt war diese Adduktbildung noch nicht als Halogenbindung definiert. Die Definition durch die IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) folgte erst ca. 200 Jahre später. Diese Definition gibt an, dass eine Halogenbindung durch inter- oder intramolekulare anziehende Effekte zwischen einer mit einem Halogen assoziierten elektrophilen Region und einer nucleophilen Region ausgebildet wird. Dargestellt wird die Halogenbindung durch drei Punkte in einem R–Hal...Y-System. Dabei ist das Halogenatom kovalent an einem Rest gebunden. Halogenbindungsdonatoren sind typischerweise halogenierte aromatische Ringsysteme, Halogenalkane, Halonium-Ionen oder molekulare Halogene. Als Halogenbindungsakzeptoren (Y) können Verbindungen mit einem freien Elektronenpaar oder Anionen aufgefasst werden.^[113]

Durch anisotrope Verteilung von Elektronen in der äußeren Schale von Halogenatomen entstehen Bereiche mit positiver Partialladung am distalen Ende des Halogenatoms (σ -hole) (Abbildung 1-13).^{[114],[115]} Dieses σ -hole wird durch elektronenreiche Wasserstoffbrückenakzeptoren adressiert.

Die Halogenbindung ist durch geometrische Eigenschaften gekennzeichnet. Dabei sind vor allem die Entfernung zwischen Hal und Y sowie der Winkel (σ -hole-Winkel) des R–Hal...Y-Systems entscheidend. Die Größe des σ -holes steigt mit zunehmendem Atomradius des Halogenatoms an ($F < Cl < Br < I$).^[115] Der Abstand zwischen den Bindungspartnern sollte die Summe der van-der-Waals *radii* nicht überschreiten (Tabelle 1-4). Kristallographische Daten führen zu ca. 20% niedrigeren Radien, da in Feststoffen stärkere Wechselwirkungen beobachtet wurden.^[116] Schwache Wechselwirkungen wurden bei Iod allerdings bis 5 Å beobachtet.^[117] Unterhalb von 2.5 Å überwiegen vor allem abstoßende Effekte, sodass eine zu geringe Entfernung beider Bindungspartner kontraproduktiv ist. Obwohl der optimale σ -hole-Winkel bei 180° liegt, konnten Wechselwirkungen zwischen Halogenatomen und H-Brückenakzeptoren bis 140° beobachtet werden. Unter 140° ist die Bildung einer Halogenbindung energetisch nicht mehr sinnvoll. Diese beiden Parameter (Distanz und σ -hole-Winkel) sollten nicht einzeln betrachtet werden, da eine Abhängigkeit zwischen beiden Größen besteht.

Eine Analyse von Protein-Co-Kristallstrukturen der PDB zeigte, dass nicht alle potentiellen Halogenbindungen die optimalen geometrischen Eigenschaften aufweisen. In diesen Analysen wurden direkte Halogenbindungen zur Proteinoberfläche, wasservermittelte Halogenbindungen zum Protein, Halogenbindungen zu isolierten Wassermolekülen beschrieben und π -Elektronen-Halogenbindungen gezeigt.^{[117]–[120]}

Tabelle 1-4: Aufstellung wichtiger van-der-Waals *radii* (Å) für die Bestimmung der optimalen Entfernung zweier Halogenbindungspartner.^[116]

Atom	Kristallographischer Radius [Å] ^a	Isoliertes Atom [Å] ^b
F	1.5	1.65
Cl	1.8	2.05
Br	1.9	2.10
I	2.1	2.22
O	1.55	1.71
N	1.8	2.06
S	1.6	1.79

^a Experimentell ermittelter kristallographischer Radius. ^b Radien der isolierten Atome.

Drei Arten von Halogenbindungen können in der Co-Kristallstruktur von 4,5,6,7-Tetrabrombenzotriazol (**18**, TBB) mit CDK2 (PDB:1P5E ^[120]) beobachtet werden (Abbildung 1-13). Neben einer direkten Halogenbindung zwischen **18** und Leu83 sind eine wasservermittelte Halogenbindung zu Asp86 und eine π -Elektronen-Halogenbindung zum *gatekeeper* Phe80 erkennbar.

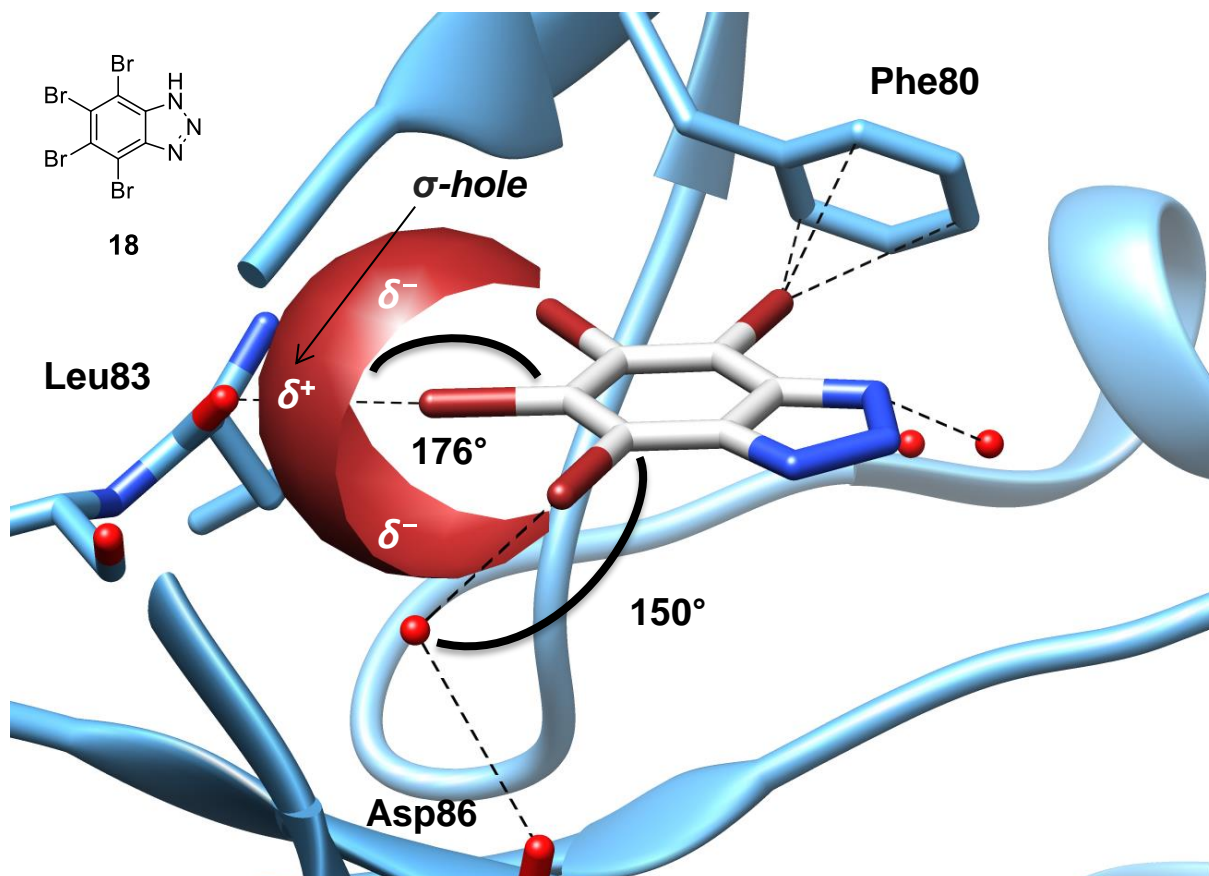


Abbildung 1-13: Co-Kristallstruktur von **18** in der humanen CDK2 (PDB:1P5E ^[120]) mit drei Arten von Halogenbindungen. Die elektrostatische Oberfläche eines Brom-Substituenten ist rot dargestellt. Direkte Halogenbindung zwischen TBB und Leu83; Distanz (unterbrochene Linien): 2.9 Å und σ -hole-Winkel: 176°. Wasservermittelte Halogenbindung zu Asp86; Distanz: 3.0 Å und σ -hole-Winkel: 150°. π -Elektronen-Halogenbindung zum *gatekeeper* Phe80; Distanz 3.2–4.4 Å; σ -hole-Winkel: nicht bestimmt. H-Brücke zwischen einem Stickstoff und einem Wassermolekül, Distanzen und σ -hole-Winkel wurden mit Chimera (Version 1.13) bestimmt^[121].

Durch die Arbeitsgruppe um MACKERELL ^[122] wurden im Jahr 2017 auch Interaktionen von Halogenatomen mit Wasserstoffbrückendonatoren in Proteinkristallstrukturen systematisch analysiert. Hierbei interagiert ein Wasserstoffatom mit dem negativen Teil der Halogenoberfläche. Der optimale Winkel der R–Hal...HY-Bindung, liegt in diesem Fall bei 90°, da durch ein Wasserstoffatom der seitlich gelegene negative Teil des Halogens adressiert wird. Die Länge der R–Hal...HY-Bindung sollte zwischen 3.2 und 4.0 Å liegen. Die Darstellung dieser Bindung ist in Abbildung 1-14 realisiert (PDB:2WHO ^[123]).

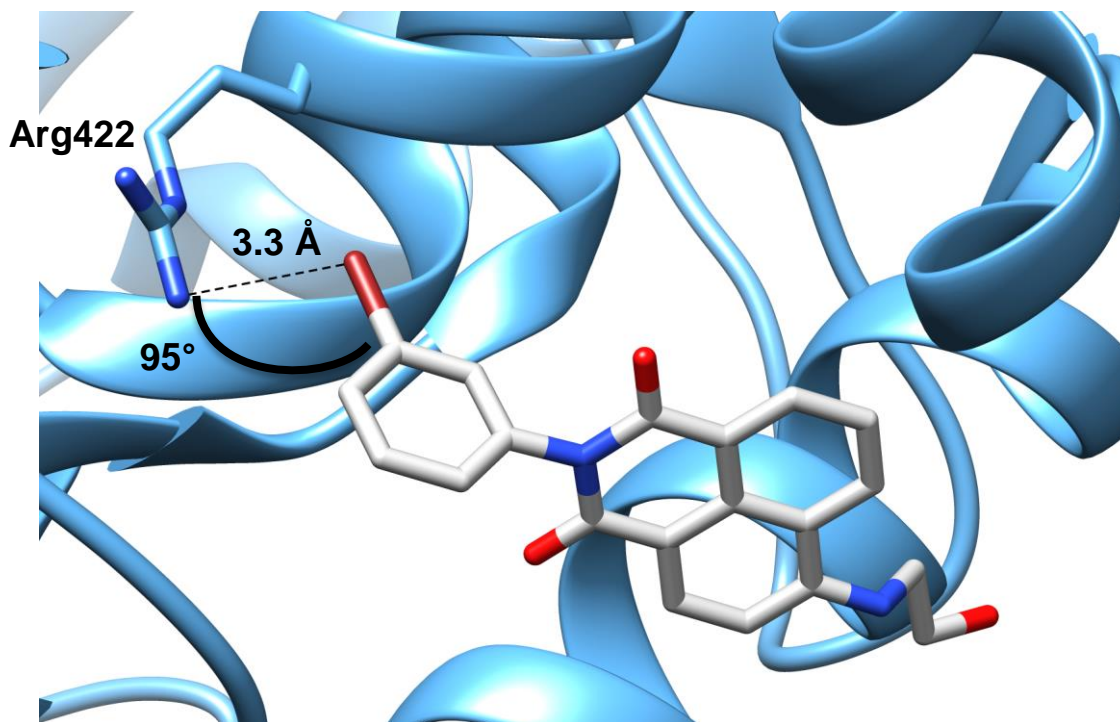


Abbildung 1-14: Co-Kristallstruktur von 2-(3-Bromphenyl)-6-[(2-hydroxyethyl)amino]-1*H*-benz[*de*]-isochinolin-1,3-(2*H*)-dion in der Hepatitis C Polymerase NS5B Genotyp B (hellblau, PDB:2WHO) ^[123]. Wechselwirkung zwischen dem 3-Brom-Substituenten mit Arg422 über eine Halogenwasserstoffbrückenbindung., Distanz (unterbrochene schwarze Linien): 3.3 Å, Winkel 95°, bestimmt mit Chimera (Version 1.13) ^[121].

1.5 Physikochemische Eigenschaften in der Wirkstoffentwicklung

Neben einer hohen Hemmaktivität sind physikochemische Eigenschaften, wie die Permeabilität, die Löslichkeit (S-Wert), die Anzahl von rotierbaren Bindungen, die Anzahl an aromatischen Ringsystemen, das sp^3/sp^2 -Verhältnis, der Verteilungskoeffizient (P-Wert), der Distributionskoeffizient (D-Wert) und der Schmelzpunkt wichtige Entscheidungskriterien im Verlauf der Strukturentwicklung eines Wirkstoffkandidaten. Durch Verknüpfung mit der Hemmaktivität können die *ligand efficiency* (LE) und die *lipophilic ligand efficiency* (LLE) bestimmt werden. In frühen Entwicklungsphasen entscheiden diese Parameter bereits, ob eine Substanz als Wirkstoffkandidat geeignet ist, da sie für die ADME-Parameter (*absorption, distribution, metabolism* und *excretion*) und damit für die Bioverfügbarkeit relevant sind.^[124]

1.5.1 Permeabilität und Wasserlöslichkeit

Zur Abschätzung der Permeabilität und Löslichkeit wird vor allem die „Lipinski *Rule of Five*“ (RO5) verwendet. Eine ausreichende Permeabilität von Biomembranen wird eher von Substanzen erreicht, die eine relative Molmasse von weniger als 500 g/mol, einen berechneten logP-Wert (clogP-Wert) von unter 5, weniger als 5 H-Brückendonatoren und weniger als 10 H-Brückenakzeptoren aufweisen. Auch Substanzen, die diese Eigenschaften nicht erfüllen, können bioverfügbar sein, da z.B. ein Transport von aktiven Transporten durch Biomembranen möglich ist.^[125] Die „*Rule of Five*“ wird durch die Anzahl an rotierbaren Bindungen ergänzt. Da eine geringe orale Bioverfügbarkeit häufig mit der Anzahl von rotierbaren Bindungen innerhalb eines Moleküls korreliert, sollte deren Anzahl unterhalb von 10 liegen.^[126] Auf die Parameter der RO5 sollte daher schon während der Entwicklung von Arzneistoffen geachtet werden. Die Permeabilität eines Wirkstoffkandidaten wird zum Beispiel mit dem Caco2-Modell oder dem *Parallel artificial membran permeability assay* (PAMPA) bestimmt. Beim Caco2-Modell wird eine *monolayer* Zellschicht, die aufwendig aus einer Zellkultur gewonnen werden muss, verwendet. Bestimmt werden neben der passiven Diffusion, die für ca. 80-95% der Wirkstoffkandidaten am wichtigsten ist, zusätzlich auch der aktive Transport und der aktive Efflux durch die Membran. Diese Kombination bedeutet, dass die wichtige passive Diffusion mit dem Caco2-Modell nicht isoliert untersucht werden kann. Aus diesem Grund sowie wegen der langen Vorbereitungszeit und des geringen Probendurchsatzes wurde nach einer weniger aufwendigen und günstigeren Methode als Alternative zum Caco2-Modell zur Bestimmung der passiven Diffusion gesucht. Im PAMPA wird lediglich die passive Diffusion durch eine Phospholipidmembran bestimmt.^{[124],[127],[128]} Der PAMPA liefert dadurch eine andere Aussage als das Caco2-Modell, weil aktive Transportvorgänge nicht berücksichtigt werden.^[125]

Neben der für die Bioverfügbarkeit wichtigen Permeabilität ist die Wasserlöslichkeit einer Substanz ein wichtiges Kriterium in der Wirkstoffentwicklung. Diese beiden Parameter sollten unbedingt zusammen betrachtet werden, da eine zu große Hydrophilie zu einer geringen Permeabilität führen kann. Die molare Löslichkeit (S) gibt an, wie viel Mol einer Verbindung sich in einem Liter Lösungsmittel lösen. Die Bestimmung der Löslichkeit wird vor allem mit zwei Methoden durchgeführt. Als Goldstandard wird die Bestimmung der thermodynamischen Löslichkeit ($S_{\text{therm.}}$) betrachtet. Bei der Bestimmung wird die maximal erreichbare Konzentration der thermodynamisch stabilsten Form im Gleichgewicht zu einem Bodensatz in einer Lösung bestimmt. Des Weiteren kann die kinetische Löslichkeit ($S_{\text{kin.}}$) bestimmt werden. Hier wird die Konzentration, ab der die am schnellsten präzipitierende Form ausfällt, bestimmt.^[129] Die kinetische Löslichkeit ist jedoch nicht auf das alleinige Lösungsmittel Wasser bezogen, da eine Stammlösung mit DMSO hergestellt wird. Diese Stammlösung wird zwar stark verdünnt, jedoch ist der geringe Anteil DMSO in der Probenverdünnung als Lösungsvermittler aufzufassen. Von einer guten Löslichkeit wird ab einer Konzentration von 200 μM gesprochen. Eine mittelmäßige Löslichkeit liegt zwischen 30 und 200 μM . Als unzureichende Löslichkeit wird dementsprechend eine Konzentration von unter 30 μM angesehen.^[130]

Der $\log S$ -Wert ist der dekadische Logarithmus der molaren Löslichkeit und ist ein Maß für die Löslichkeit einer Substanz. Er kann durch verschiedene Methoden vorhergesagt werden oder experimentell bestimmt werden.^{[131]–[133]} Abhängig ist die Wasserlöslichkeit von der Temperatur und dem pH-Wert.^{[131],[133]}

Permeabilität und Wasserlöslichkeit werden im *Biopharmaceutical Classification System* (BCS) zur Bewertung der Eigenschaften von Wirkstoffen und Entwicklungskandidaten herangezogen. Das BCS untergliedert sich in vier Kategorien, die Wirkstoffe hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften einteilen (Tabelle 1-5).^[134] In Klasse I befinden sich Wirkstoffe, die aufgrund ihrer hohen Permeabilität und Löslichkeit eine hohe Bioverfügbarkeit aufweisen. In Klasse II hingegen ist die Bioverfügbarkeit von der Lösungsgeschwindigkeit abhängig. Die Bioverfügbarkeit in Klasse III ist von der Permeabilität abhängig. Arzneistoffe der Klasse IV sind äußerst selten, da sie kaum bioverfügbar sind. Durch besondere Formulierungen kann ihre Bioverfügbarkeit gesteigert werden. Cyclosporin A wird beispielsweise der Klasse IV des BCS zugeteilt. Die orale Bioverfügbarkeit von Cyclosporin A kann durch Formulierung von Nanopartikeln, die bei Kontakt mit Wasser eine Mikroemulsion bilden, gesteigert werden.^[135]

Tabelle 1-5: *Biopharmaceutical Classification System (BCS)*: Einteilung der vier Klassen mit Beispielen aus der Literatur.^[136]

Klasse	Permeabilität	Löslichkeit	Beispiele
I	Hoch	Hoch	Metoprolol, Paracetamol
II	Hoch	Niedrig	Carbamazepin, Glibenclamid
III	Niedrig	Hoch	Metformin, Ranitidin
IV	Niedrig	Niedrig	Cyclosporin A, Taxol

1.5.2 Anzahl aromatischer Ringe und Fsp³-Verhältnis

Eine höhere Anzahl an aromatischen Ringsystemen in einem Wirkstoffmolekül bringt viele Probleme mit sich, da aufgrund der Planarität und hohen Lipophilie geringe Wasserlöslichkeit und hohe Affinität zum Serum-Albumin resultiert. Dadurch sinkt der bioverfügbare Anteil stark ab. Daher weisen oral bioverfügbare Wirkstoffe im Durchschnitt lediglich 1.6 aromatische Ringsysteme auf. Aufgrund der geringen Flexibilität von aromatischen Ringsystemen zeigen Verbindungen, die viele Aromaten aufweisen, häufig höhere Hemmaktivitäten in biologischen Testverfahren. RITCHIE und MACDONALD zeigten auf, dass die Zahl an aromatischen Ringsystemen maximal drei, besser eins oder zwei, betragen sollte.^[137]

Das Verhältnis von sp³-hybridisiertem Kohlenstoff zum Gesamtkohlenstoff wird Fsp³-Verhältnis (*Fraction Csp³*) genannt (Formel 1-1). Dieses Verhältnis zeigt eine Korrelation mit der Wasserlöslichkeit und dem Schmelzpunkt. Je höher der Fsp³-Wert ist, desto niedriger liegt der Schmelzpunkt und desto höher die Wasserlöslichkeit. Der Fsp³-Wert von Wirkstoffen in der Entwicklung lag durchschnittlich bei 0.36, bei Wirkstoffen auf dem Markt bei 0.47.^[138]

$$F_{sp^3} = \frac{\text{Anzahl } sp^3\text{Kohlenstoffatome}}{\text{Gesamtanzahl Kohlenstoffatome}}$$

Formel 1-1: Berechnung des Fsp³-Verhältnisses.

1.5.3 LogP, logD und Schmelzpunkt

Der logP-Wert beschreibt die Lipophilie einer chemischen Substanz. Dabei handelt es sich um den dekadischen Logarithmus des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten. Bei einem $\log P > 0$ hat eine Verbindung einen lipophileren Charakter, bei einem $\log P < 0$ hingegen einen hydrophileren. Der logP-Wert kann z. B. durch ein Model von VISWANADHAN *et al.* vorhergesagt werden.^[139] Dabei werden einzelne Atome oder Atomgruppen mit einem Score versehen. Die Kombination der Scores liefert eine Abschätzung des logP-Wertes. Durch Abwandlung des logP-Wertes wird der logD-Wert erhalten. Dieser berücksichtigt den Einfluss unterschiedlicher pH-Werte, da neben der Neutralform der Verbindung auch die unterschiedlich vorliegenden ionisierten Formen in die Betrachtungen einbezogen werden.

Die Wasserlöslichkeit korreliert häufig mit dem Schmelzpunkt, da zum Lösen einer Verbindung die Feststoffbrücken innerhalb eines Kristalls gelöst werden müssen. Diese Gitterenergie wird durch den Schmelzpunkt repräsentiert. Dies wird durch die Verknüpfung aus Schmelzpunkt und logP-Wert in der YALKOWSKY-Gleichung (Formel 1-2), mit der die Wasserlöslichkeit abgeschätzt werden kann, verdeutlicht. Je höher der Schmelzpunkt und der logP-Wert sind, desto niedriger ist die Wasserlöslichkeit.^[140]

$$\log S = 0.5 - 0.01 \cdot (\text{Schmelzpunkt} - 25) - \log P$$

Formel 1-2: YALKOWSKY-Gleichung ^[140] zur Abschätzung der Wasserlöslichkeit.

1.5.4 LE und LLE

Die LE und LLE-Wert sind Parameter zur Abschätzung der *druglikeness*. In die Berechnung von LE und LLE gehen Lipophilie und biologische Aktivität ein. Die beiden Werte geben Auskunft, ob eine Verbindung ein potentieller Entwicklungskandidat ist. LE bzw. LLE-Werte verschiedener Verbindungen sollten nur unter der Verwendung des gleichen *in vitro* Assays miteinander verglichen werden.^[124]

Der LE-Wert berücksichtigt die biologische Hemmaktivität pro *heavy atom* (HA, alle Atome außer Wasserstoff). Der LE-Wert wird annäherungsweise über die freie Enthalpie (ΔG) berechnet. Da ΔG selten bestimmt wird, werden Standardbedingungen (300 K und eine Konzentration von 1 mol/L) angenommen, was für ΔG annäherungsweise -1.37 kcal/mol ergibt. Die Dissoziationskonstante (K_d) kann durch den IC_{50} -Wert ersetzt werden. Durch Verwendung des negativ dekadischen Logarithmus des IC_{50} -Wertes und anschließender Multiplikation der freien Enthalpie pro HA kann der LE-Wert berechnet werden (Formel 1-3). Der LE-Wert sollte für Wirkstoffkandidaten über 0.3 kcal/mol/HA liegen.^[141]

$$LE = \frac{-\Delta G}{HA} \approx \frac{-\left(-1.37 \frac{kcal}{mol}\right)}{HA} \cdot pIC_{50}$$

Formel 1-3: Berechnung des LE-Wertes nach HOPKINS.^[141]

Der LLE-Wert verknüpft den logP-Wert mit der *in vitro* Hemmaktivität und wird durch Subtraktion des clogP-Wertes von $-\log(IC_{50})$ (Formel 1-4) ermittelt. Der LLE-Wert sollte für Wirkstoffkandidaten größer als fünf sein.^[141]

$$LLE = pIC_{50} - \log P$$

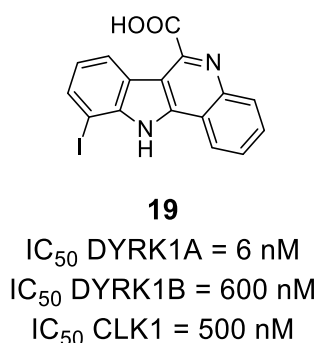
Formel 1-4: Berechnung des LLE-Wertes nach HOPKINS.^[141]

Entwicklungskandidaten sollten demnach eine hohe biologische Hemmaktivität bei möglichst niedriger Lipophilie aufweisen. Außerdem sollte während der Entwicklung von Arzneistoffkandidaten eine Erhöhung der biologischen Hemmaktivität ohne Erhöhung der Lipophilie erfolgen.

1.6 Aufgabenstellung

DYRK1A ist aufgrund der Beteiligung an verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen ein vielversprechendes Target in der Wirkstoffforschung. FALKE *et al.* gelang es, mit halogensubstituierten 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren hochpotente und selektive DYRK1A-Inhibitoren zu synthetisieren. Die potenteste Verbindung trägt einen Iod-Substituenten in 10-Position (**19**, IC₅₀ = 6 nM). Durch den Austausch des 10-Iod-Substituenten durch andere Halogen-Substituenten sank die Aktivität an DYRK1A (10-Chlor: IC₅₀ = 31 nM, 10-Brom: IC₅₀ = 20 nM), weshalb eine Beteiligung von Halogenbindungen diskutiert wurde.^[50]

Die vielversprechenden *in vitro*-Ergebnisse konnten jedoch in zellbasierten Experimenten nicht bestätigt werden. In HEK293-Zellen, die DYRK1A überexprimieren, konnte die Hyperphosphorylierung des *tau*-Proteins an Thr212 durch Verbindung **19** lediglich mit einem EC₅₀-Wert von 2.1 µM gehemmt werden. Dieser Wert ist ca. doppelt so groß wie die geforderten 1 µM für chemische Sonden.^[75] Der Unterschied zwischen den *in vitro*-Ergebnissen und den zellbasierten Ergebnissen kam vermutlich durch eine geringe zelluläre Aufnahme zustande. Diese Beobachtung lässt sich durch die physikochemischen Eigenschaften von Verbindung **19** erklären (Abbildung 1-15).^[50]



Physikochemische Eigenschaften:

M_r = 388.16 g/mol

logP_{calc} = 4.24

H-Brücken-Donatoren: 2

H-Brücken-Akzeptoren: 3

Rotierbare Bindungen: 1

S_{therm.}(pH 7.4) = < 5 µM

S_{kin.}(pH 7.4) = 5.28 µM (4.99-5.57 µM)

Aromatische Ringsysteme: 4

Fsp³-Verhältnis: 0.00

Zersetzungspunkt: 358-359 °C

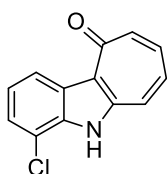
LE-Wert: 0.54 kcal/mol/HA

LLE-Wert: 4.0

Abbildung 1-15: Aufstellung der physikochemischen Eigenschaften von **19**. In blau sind die Kriterien an einen Wirkstoffkandidaten die erfüllt werden und in rot die Kriterien, die nicht erfüllt werden, dargestellt. Die Berechnung des clogP-Wertes wurde mit MarvinSketch^[142] durchgeführt. H-Brücken-Donatoren/Akzeptoren und rotierende Bindungen wurden mit SwissADME^[143] bestimmt. Die Löslichkeit wurde von MEINE bestimmt.^[144]

Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit und des aromatischen Charakters eignet sich Verbindung **19** nicht als Standardinhibitor für DYRK1A in zellulären Experimenten. Eine Untersuchung der Permeabilität von **19** wurde bisher nicht durchgeführt.

Um die physikochemischen Eigenschaften zu verbessern, wurden von FALKE Analoga mit einer geringeren Molmasse entwickelt. 4-Chlorcyclohepta[*b*]indol-10(5*H*)-on (**20**) (Abbildung 1-16) und 8-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**21**) (Abbildung 1-16) zeigten verbesserte physikochemische Eigenschaften, jedoch eine geringere Aktivität an DYRK1A (Abbildung 1-16).



20

IC₅₀ DYRK1A = 0.20 μM

IC₅₀ CLK1 = 0.17 μM

Physikochemische Eigenschaften:

M_r = 229.66 g/mol

clogP = 2.79

H-Brücken-Donatoren: 1

H-Brücken-Akzeptoren: 1

Rotierbare Bindungen: 0

S_{therm.}(pH 7.4) = < 5 μM

S_{kin.}(pH 7.4) = 26.1 μM (25.6-26.5 μM)

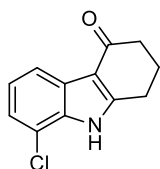
Aromatische Ringsysteme: 3

Fsp³-Verhältnis: 0.00

Zersetzungspunkt: > 357 °C

LE-Wert: 0.40 kcal/mol/HA

LLE-Wert: 3.91



21

IC₅₀ DYRK1A = 1.6 μM

IC₅₀ CLK1 = 0.30 μM

Physikochemische Eigenschaften:

M_r = 219.67 g/mol

clogP = 2.19

H-Brücken-Donatoren: 1

H-Brücken-Akzeptoren: 1

Rotierbare Bindungen: 0

S_{therm.}(pH 7.4) = nicht bestimmt

S_{kin.}(pH 7.4) = nicht bestimmt

Aromatische Ringsysteme: 2

Fsp³-Verhältnis: 0.25

Schmelzpunkt: 266-267 °C

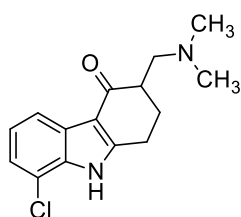
LE-Wert: 0.53 kcal/mol/HA

LLE-Wert: 3.61

Abbildung 1-16: Aufstellung der physikochemischen Eigenschaften von **20** und **21**. Blau sind die Kriterien an einen Wirkstoffkandidaten, die erfüllt wurden, und rot die Kriterien, die nicht erfüllt wurden dargestellt. Die Berechnung des clogP-Wertes wurde mit MarvinSketch ^[142] durchgeführt. H-Brücken-Donatoren/Akzeptoren und rotierbare Bindungen wurden mit SwissADME ^[143] bestimmt. Die Schmelzpunkte und Hemmaktivitäten wurden der Dissertation von FALKE entnommen.^[145]

Auch die physikochemischen Eigenschaften der verkleinerten Analoga **20** und **21** lagen nicht im optimalen Bereich. Dennoch wurde aufgrund des niedrigeren clogP-Wertes, des geringeren aromatischen Charakters und des verbesserten Fsp³-Wertes ein struktur-basiertes Wirkstoffdesign mit Verbindung **21** durchgeführt. Die biologische Aktivität und die physikochemischen Eigenschaften sollten durch die Einführung von basischen Seitenketten verbessert werden. Durch computergestützte Analysen sollten verschiedene basische Seitenketten evaluiert und anschließend als geeignet erscheinende Verbindungen synthetisiert und für die biologische Testung bereitgestellt werden. Von den Testergebnissen sollten Struktur-Aktivitätsbeziehungen abgeleitet werden und für ausgewählte Derivate sollten die relevanten physikochemischen Eigenschaften bestimmt werden. Außerdem sollte durch Variation der Position des Halogenatoms der Einfluss dieses Substituenten bestimmt werden.

Am Beispiel von 8-Chlor-3-[(dimethylamino)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**22**) (Abbildung 1-17) zeigte sich eine deutliche Verbesserung der theoretisch bestimmbaren physikochemischen Eigenschaften.



22a

Physikochemische Eigenschaften:

M_r = 276.76 g/mol

clogP = 2.17

H-Brücken-Donatoren: 1

H-Brücken-Akzeptoren: 2

Rotierbare Bindungen: 2

$S_{\text{therm.}}$ (pH 7.4) = nicht bestimmt

$S_{\text{kin.}}$ (pH 7.4) = nicht bestimmt

Aromatische Ringsysteme: 2

Fsp³-Verhältnis: 0.40

Schmelzpunkt: nicht bestimmt

LE-Wert: nicht bestimmt

LLE-Wert: nicht bestimmt

Abbildung 1-17: Aufstellung der physikochemischen Eigenschaften von **22**. Blau sind die Kriterien, die erfüllt wurden, dargestellt. Die Berechnung des clogP-Wertes wurde mit MarvinSketch ^[142] durchgeführt. H-Brücken-Donatoren/Akzeptoren und rotierbare Bindungen wurden mit SwissADME ^[143] bestimmt.

Die Einführung einer basischen Seitenkette mittels einer Mannich-Reaktion ist bereits eine etablierte Vorgehensweise zur Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften und wurde bereits bei einem zugelassenen Arzneistoff realisiert. Rolitetrazyklin (**23**) (Abbildung 1-18) ist ein Prodrug von Tetrazyklin (**24**). Es ist als *N*-Mannich-Base hydrophiler als die Wirkform und kann intravenös appliziert werden. Eine orale Gabe von Rolitetrazyklin ist aufgrund einer unzureichenden Absorption (zu hydrophil) allerdings nicht mehr möglich. Arzneistoff **23** ist das einzige Tetrazyklin, das aufgrund guter Wasserlöslichkeit intravenös verabreicht werden kann.^[146]

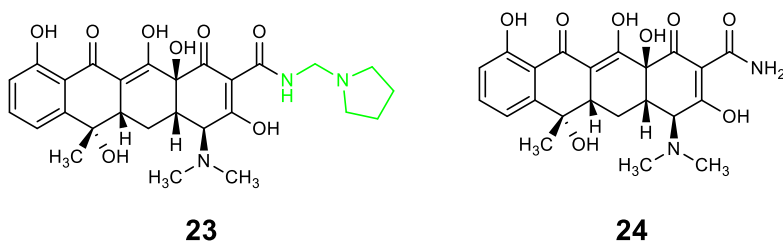


Abbildung 1-18: Rolitetrazyklin (**23**) und Tetrazyklin (**24**). Rolitetrazyklin ist ein Beispiel einer Mannich-Base, die verbesserte physikochemische Eigenschaften aufweist. In grün ist die Struktur der *N*-Mannich-Base hervorgehoben.

2 Wirkstoffdesign

2.1 Molekulares *docking*

Ein Struktur-basiertes Wirkstoffdesign wird mit Hilfe von computergestützten Vorhersagen durchgeführt. Basierend auf einem bekannten Inhibitor wird durch strukturelle Veränderungen versucht, eine höhere Hemmaktivität und Selektivität zu erzeugen. Die Proteinstruktur und die Struktur des Inhibitors müssen dafür bekannt sein. Proteine, für die in der PDB keine Co-Kristallstruktur zur Verfügung steht, können zum Beispiel durch eine Homologie-Modellierung untersucht werden. Hierfür dient ein ähnliches Protein, z. B. aus derselben Proteinfamilie, als Template. Eine Leitstruktur kann durch Optimierung eines *hits*, der in einem so genannten *high throughput screening* (HTS) gefunden wurde, erhalten werden.^[147] Bei diesem HTS werden Substanzbibliotheken, die eine hohe Anzahl an Verbindungen enthalten, getestet. Die Tests können zum einen das Target und zum anderen den Phänotyp in den Fokus stellen.

Aktuell sind 30 Co-Kristallstrukturen für DYRK1A in der PDB hinterlegt. Ein häufig angewandtes Werkzeug für eine *in silico* Vorhersage von möglichen Bindemodi in der Bindetasche von Proteinkinasen sind *docking*-Programme. Es stehen mittlerweile mehr als 60 Programme für die Vorhersage von Bindungsmodi zur Verfügung. Zu den etablierten Programmen gehören z. B. DOCK, AutoDock, FlexX, Glide oder GOLD.^[148] In der hier vorgelegten Arbeit wurde das Programm GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) für die *docking*-Analysen verwendet. Es basiert auf einem genetischen Algorithmus, der auf Rekombination verschiedener ermittelter *docking*-Posen basiert.^[149] Verschiedene Konformationen für den Liganden werden dabei ermittelt, kombiniert und getestet. Einschränkungen der Flexibilität liegen bei der Konformation des Proteins vor, da eine gewisse Starrheit bei Proteinen für eine ordnungsgemäße Funktion vorausgesetzt wird. Seitenketten von Aminosäuren innerhalb des Proteins können hingegen flexibel sein und damit neue Interaktionen zu Liganden ermöglichen. Beim *docking* werden die designten Ligandenmoleküle in eine im Vorfeld definierte Bindestelle eingesetzt und die erhaltenen Posen mit *scoring*-Methoden bewertet. Bei Proteinkinasen können durch vorherige Analyse der ATP-Bindetasche und der ausgebildeten Interaktionen zwischen Ligand und Protein Hitstrukturen modifiziert und optimiert werden. Die Durchführung von *docking*-Experimenten führt jedoch häufig zu unrealistischen Ergebnissen, sodass eine visuelle Analyse der erzeugten Bindemodi notwendig ist. In dieser Arbeit wurde zur Bewertung der *docking*-Posen die ChemScore-Methode verwendet, in der zusätzliche Parameter für Proteinkinasen implementiert sind.^[150] Die ChemScore-Methode stellt eine empirische Methode dar, die den Beitrag von verschiedenen Bindungsenergien berücksichtigt. Grundlegende Interaktionen, die in den ChemScore einfließen, sind unter anderem H-Brücken, lipophile Wechselwirkungen oder metallische Interaktionen mit der Proteinoberfläche.^[151]

Auch eine Kollision (*clash*) zwischen Proteinoberfläche und Ligandenoberfläche wird in den *score* miteinbezogen.^[151] Ein Vergleich des *docking-scores* von unterschiedlichen Liganden ist somit nicht sinnvoll, da der Beitrag für jeden Liganden unterschiedlich ist. Eine Berücksichtigung von Wassermolekülen, die in der Bindetasche von Co-Kristallstrukturen auftreten können, kann mit GOLD ebenfalls durchgeführt werden. Dem Programm wird mit der *toggle*-Funktion so eine Wechselwirkung mit ausgewählten Wassermolekülen in der Nähe der ATP-Bindetasche von DYRK1A erlaubt. Sollte eines dieser im Vorfeld ausgewählten Wassermoleküle durch Vermittlungen von zusätzlichen Interaktionen einen positiven Effekt auf die Bindungsaffinität zur Proteinoberfläche aufweisen, wird dieses Molekül für die Berechnung des ChemScores berücksichtigt. Eine Berücksichtigung von Halogenbindungen zur Proteinoberfläche ist bisher in *docking*-Experimenten nicht möglich.

2.2 Bindemodi von DYRK1A-Inhibitoren

Von den publizierten 30 Co-Kristallstrukturen von DYRK1A wurden drei ausgewählt, um charakteristische Bindungsmotive und Interaktionsmuster zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Co-Kristallstrukturen von Harmin (**1**), XMD7-117 (**25**), Iod-11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**19**) sowie zusätzlich einer unveröffentlichten Co-Kristallstruktur von der Verbindung 4-Chlorcyclohepta[*b*]indol-10(5*H*)-on (**20**)^[152] untersucht.

2.2.1 Bindemodus von Harmin

Harmin (**1**) wurde bereits im Jahr 2010 mit DYRK1A co-kristallisiert (PDB:3ANR^[100]). Die Bindetasche von DYRK1A enthält vor allem Aminosäuren mit hydrophobem Charakter (vgl. Tabelle 1-1–2). Daher ist es nicht verwunderlich, dass das starre Grundgerüst von **1** tief in der Bindetasche liegt (Abbildung 2-1). H-Brücken werden von der Methoxygruppe zur *hinge*-Region (Leu241) und von dem Piperidin-Stickstoff zum konservierten Lys188 sowie zu Asp307 des DFG-Motivs ausgebildet (Abbildung 2-2).

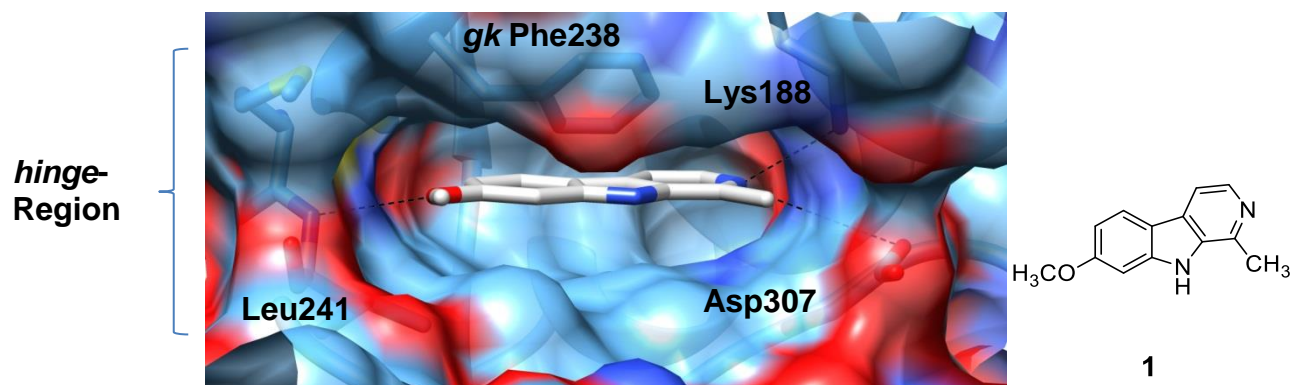


Abbildung 2-1: Lage von Harmin (1, grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (PDB:3ANR^[100]). Wechselwirkungen mit Leu241 der *hinge*-Region, Lys188 und Asp307 (dargestellt in schwarzen unterbrochenen Linien). In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt.

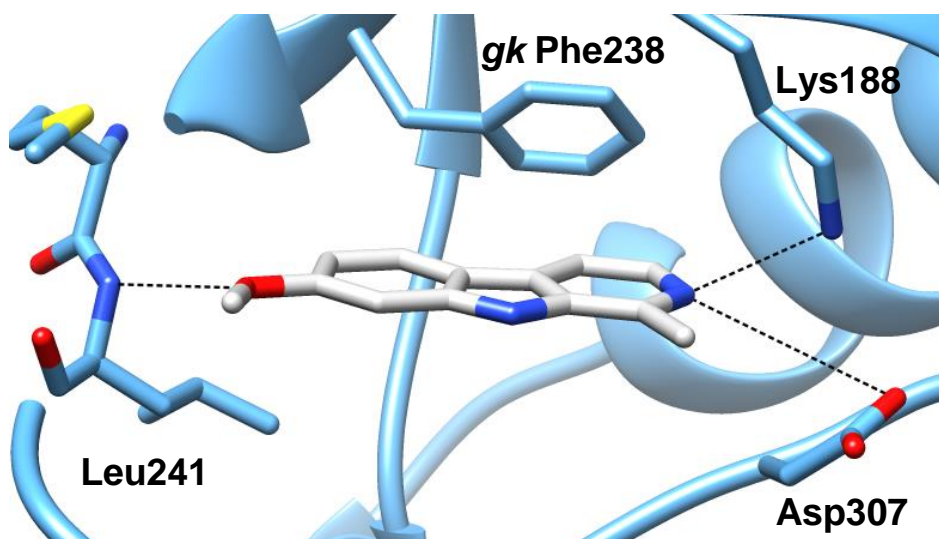


Abbildung 2-2: Ausschnitt der ATP-Bindetasche von DYRK1A zur detaillierten Darstellung des Bindungsmodus von Harmin (1, grau, PDB:3ANR^[100]). H-Brücken der Methoxygruppe mit Leu241 der *hinge*-Region und des Pyridinstickstoffes mit Lys188 und Asp307 sind als schwarze unterbrochene Linien dargestellt.

2.2.2 Bindemodus von XMD7-117

Die Kristallstruktur von XMD7-117 (25) und DYRK1A wurde erst vor kurzem veröffentlicht (PDB:6EIF).^[153] XMD7-117 ragt im Vergleich zu 1 deutlich weiter aus der Bindetasche heraus. Das Sulfonsäureamid befindet sich am Ausgang der Bindetasche. Diese Anordnung ist aufgrund des hydrophoben Charakters der ATP-Bindetasche erklärbar. Die co-kristallisierte Verbindung 25 liegt aufgrund der im Vergleich zu 1 geringeren Planarität weniger tief in der ATP-Bindetasche (Abbildung 2-3). Zwei H-Brücken zur *hinge*-Region werden von XMD7-117 durch das Azaindol-Grundgerüst ausgebildet. Dabei bildet der *N*¹-Stickstoff eine H-Brücke zu Glu239 und der *N*⁷-Stickstoff des Grundgerüsts eine H-Brücke zu Leu241 aus. Der

Pyridinstickstoff des Substituenten in 3-Position bildet eine wasservermittelte H-Brücke zum konservierten Lys188 aus (Abbildung 2-4).

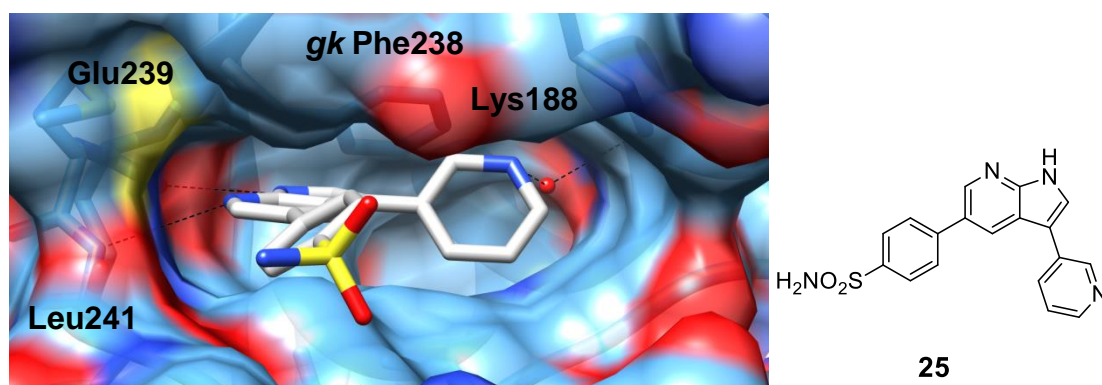


Abbildung 2-3: Lage von XMD7-117 (**25**, grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (PDB:6EIF^[153]). H-Brücken mit den *backbone*-Strukturelementen von Glu239 und Leu241 der *hinge*-Region und die wasservermittelte H-Brücke zum konservierten Lys188 werden als schwarze unterbrochene Linien dargestellt. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt.

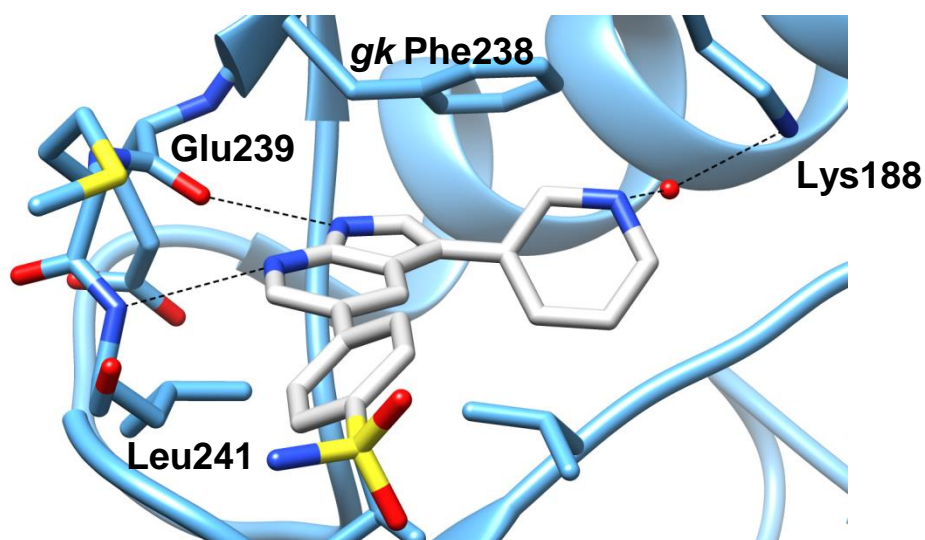


Abbildung 2-4: Detaillierte Darstellung der Interaktionen des Azaindol-Grundgerüsts von XMD7-117 (**25**, grau, PDB:6EIF^[153]) mit Glu239 und Leu241 der *hinge*-Region und die wasservermittelte H-Brücke zwischen dem Pyridinstickstoff mit Lys188. H-Brücken wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

2.2.3 Bindemodus von 10-Iod-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure

Die Co-Kristallstruktur von DYRK1A mit dem Liganden 10-Iod-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**19**, PDB:4YLJ^[50]) zeigt eine Interaktion der Carbonsäurestruktur mit einem Wassermolekül im hinteren Teil der Bindetasche. Auch eine Salzbrücke zum konservierten Lys188 wird ausgebildet.

Dies führt zu einer tiefen Lage in der ATP-Bindetasche von DYRK1A, die auch durch das flache und lipophile Erscheinungsbild von **19** ermöglicht wird. (Abbildung 2-5). Im vorderen Bereich der Bindetasche interagiert das Indolstickstoffwasserstoffatom mit einem Wasser im vorderen Teil der Bindetasche.

Eine H-Brücke zur *hinge*-Region wird nicht ausgebildet. Die hohe Hemmaktivität von **19** kann vermutlich durch eine wasservermittelte Halogenbindung vom Iod-Substituenten zum Leu241 der *hinge*-Region erklärt werden. Die geometrischen Bedingungen für eine Halogenbindung sind in diesem Fall erfüllt (Distanz: 3.7 Å, σ -hole-Winkel: 162°, Abbildung 2-6).

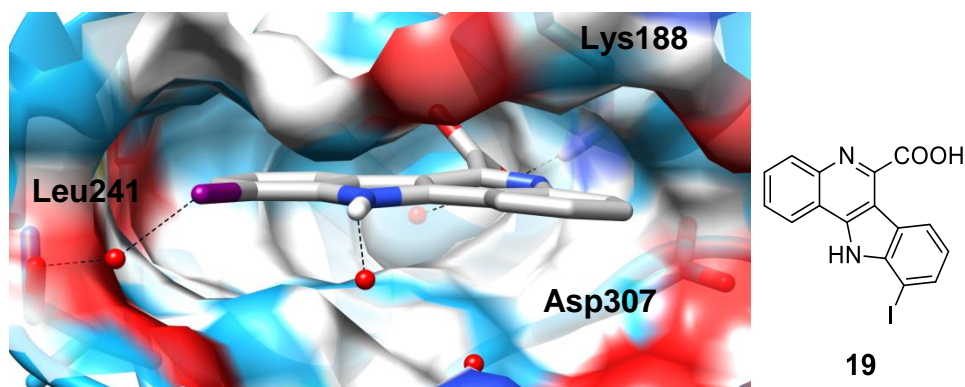


Abbildung 2-5: Lage von **19** (grau, PDB:4YLJ ^[50]) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Interaktionen zwischen dem Carbonylsauerstoffatom und Lys188 und eine mögliche wasservermittelte Halogenbindung zur *hinge*-Region sind ebenfalls dargestellt. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

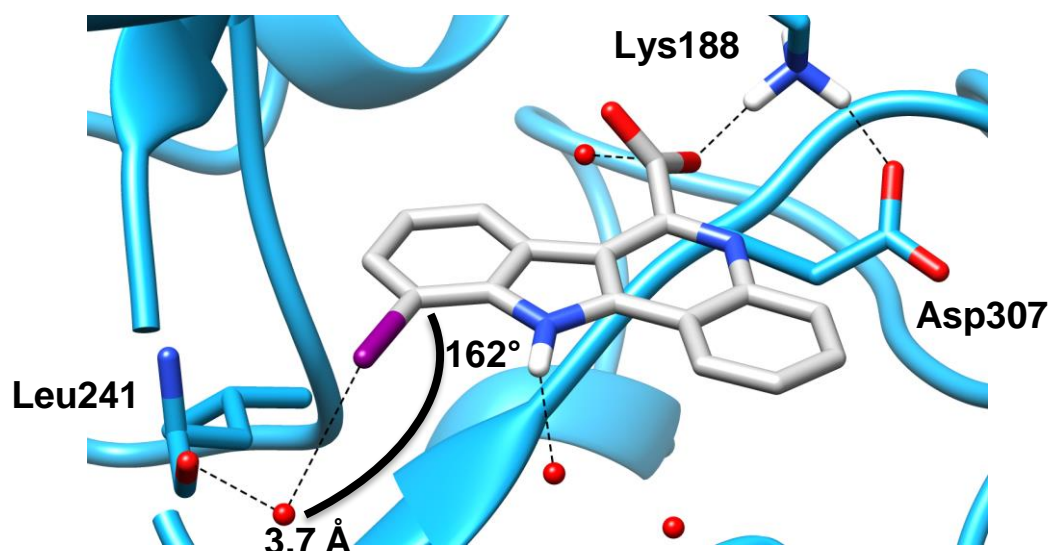


Abbildung 2-6: Detaillierte Darstellung der möglichen wasservermittelten Bindung zwischen **19** (grau, PDB:4YLJ ^[50]) und Leu241 der *hinge*-Region (geometrische Daten der möglichen Halogenbindung: Entfernung 3.7 Å (gestrichelt) und σ -hole-Winkel 162° (gebogene schwarze Linie) und H-Brücken zwischen dem Carbonylsauerstoffatom und dem *backpocket*-Wasser sowie Lys188. Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

2.2.4 Bindemodus von 4-Chlorcyclohepta[*b*]indol-10(5*H*)-on

Während bei der Analyse der ATP-Bindetasche von **1** und **25** stets H-Brücken mit der *hinge*-Region von DYRK1A ausgebildet wurden, zeigte sich diese Interaktion bei der Analyse der Lage von **20** in der ATP-Bindetasche von DYRK1A nicht. Zwar liegt **20** ebenfalls tief in der Bindestelle (Abbildung 2-5), aber interagiert nur durch eine H-Brücke zwischen dem Carbonylsauerstoffatom und dem konservierten Lys188 mit dem Protein. Eine mögliche Halogenbindung zum Leu241 der *hinge*-Region zeigte suboptimale geometrische Eigenschaften (Abbildung 2-6), die aber gerade noch im Rahmen liegen (Distanz: 3.9 Å, σ -hole Winkel: 141°, Abbildung 2-6).

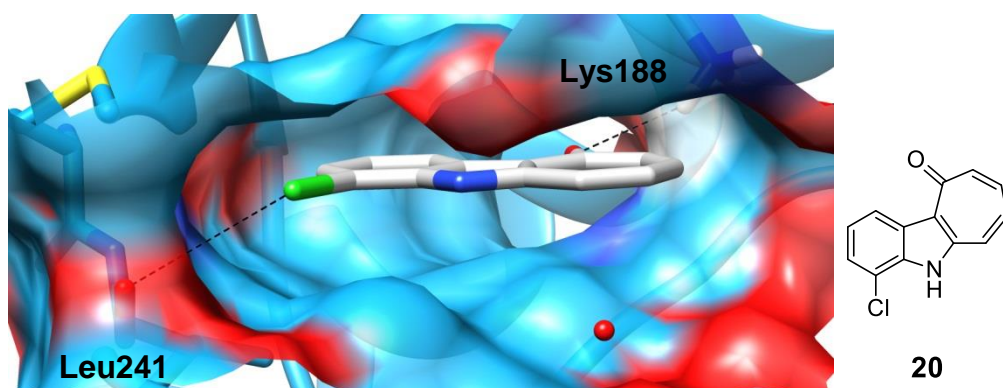


Abbildung 2-7: Lage von **20** (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A in einer nicht publizierten Co-Kristallstruktur^[152]. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

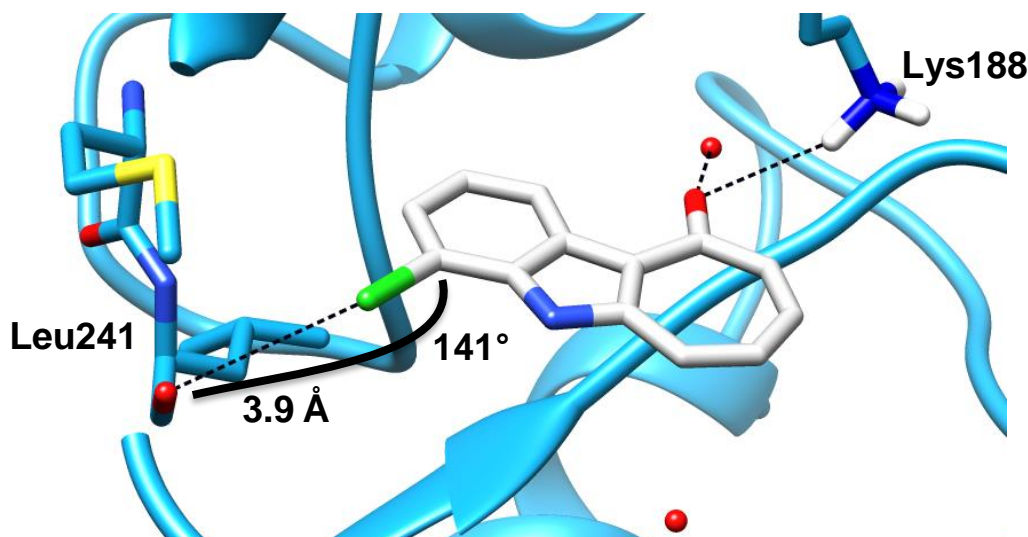


Abbildung 2-8: Detaillierte Darstellung einer möglichen Halogenbindung zwischen dem Chlor-Substituenten (grün) von **20** (grau) und Leu241 der *hinge*-Region von DYRK1A; geometrische Daten: Entfernung 3.9 Å (gestrichelt) und σ -hole-Winkel 141° (gebogene schwarze Linie) (nicht publizierte Co-Kristallstruktur von DYRK1A mit dem Liganden **20**^[152]). Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

2.3 Redocking-Experimente

Bevor *docking*-Studien durchgeführt wurden, wurde die Eignung des *docking*-Programms GOLD für die untersuchte Fragestellung mit so genannten *redocking*-Experimenten überprüft. Dieser Prozess überprüft eine ordnungsgemäße Vorhersage der Bindemodi von entworfenen Liganden während der durchgeführten *docking*-Versuche. Alle Einstellungen, die während der *docking*-Experimente verwendet wurden, waren zu denen der *redocking*-Experimente deckungsgleich. *Constraints* (festgelegte Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche) wurden nicht definiert.

Da sich die Mannich-Basen aus Verbindung **20** strukturell von den von FALKE synthetisierten 11*H*-Indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäuren ableiten, wurde die Co-Kristallstruktur von der aktivsten Verbindung **19** (PDB:4YLJ) für die *redocking*-Studien verwendet. Außerdem wurde die Co-Kristallstruktur von Verbindung **20**, das sich ebenfalls strukturell von **19** ableitet, verwendet. Beide Co-Kristallstrukturen lagen tetramer vor. Daher musste im Vorfeld eine der vier verschiedenen Ketten (A-D) durch visuelle Inspektion ausgewählt werden. Wassermoleküle, die ebenfalls in den Co-Kristallstrukturen nachgewiesen werden können, treten inhomogen verteilt auf. Um der *docking*-Software diese Interaktionspartner für die Berechnungen des ChemScores zur Verfügung zu stellen, wurde die Kette mit co-kristallisierten Wassermolekülen für das *redocking* ausgewählt.

Beim *redocking* wird der co-kristallisierte Ligand aus der Bindetasche entfernt und mit der *docking*-Software wieder in die ATP-Bindetasche der verwendeten Co-Kristallstruktur gedockt. Wassermoleküle, die in der Co-Kristallstruktur auftreten, werden durch die *toggle*-Option in die Berechnungen einbezogen. Durch Verweis auf den entsprechenden Referenzliganden berechnet GOLD einen RMSD-Wert (*root mean square deviation*). Der RMSD-Wert gibt den mittleren Abstand jedes einzelnen Ligandenatoms zu denen des entsprechenden Referenzligandenatoms in Ångström an. In der Literatur wird ein RMSD von kleiner 2 Å gefordert.^[151] In den *docking*-Versuchen wurden außerdem vielfältige Lösungsvorschläge seitens GOLD zugelassen, sodass zehn verschiedene *docking*-Posen resultierten. In beiden *redocking*-Versuchen konnte die Originalpose mit dem höchsten ChemScore näherungsweise reproduziert werden. Für Verbindung **20** ergab sich ein RMSD-Wert von 1.22 Å (Abbildung 2-9A) und für Verbindung **19** ein RMSD-Wert von 0.42 Å (Abbildung 2-9B). Beide Liganden zeigten eine H-Brücke zu einem Wassermolekül im hinteren Bereich der Bindetasche. Im Gegensatz zur Co-Kristallstruktur der Verbindung **19** konnte für die Co-Kristallstruktur von **20** kein Wassermolekül in der Nähe der *hinge*-Region gefunden werden. Aufgrund des niedrigeren RMSD-Wertes und des Wassermoleküls, das bei Verbindung **19** eine potentielle Vermittlung einer Halogenbindung zu Leu241 ermöglicht, wurde die Co-Kristallstruktur von **19** für die *docking*-Experimente dieser Arbeit verwendet.

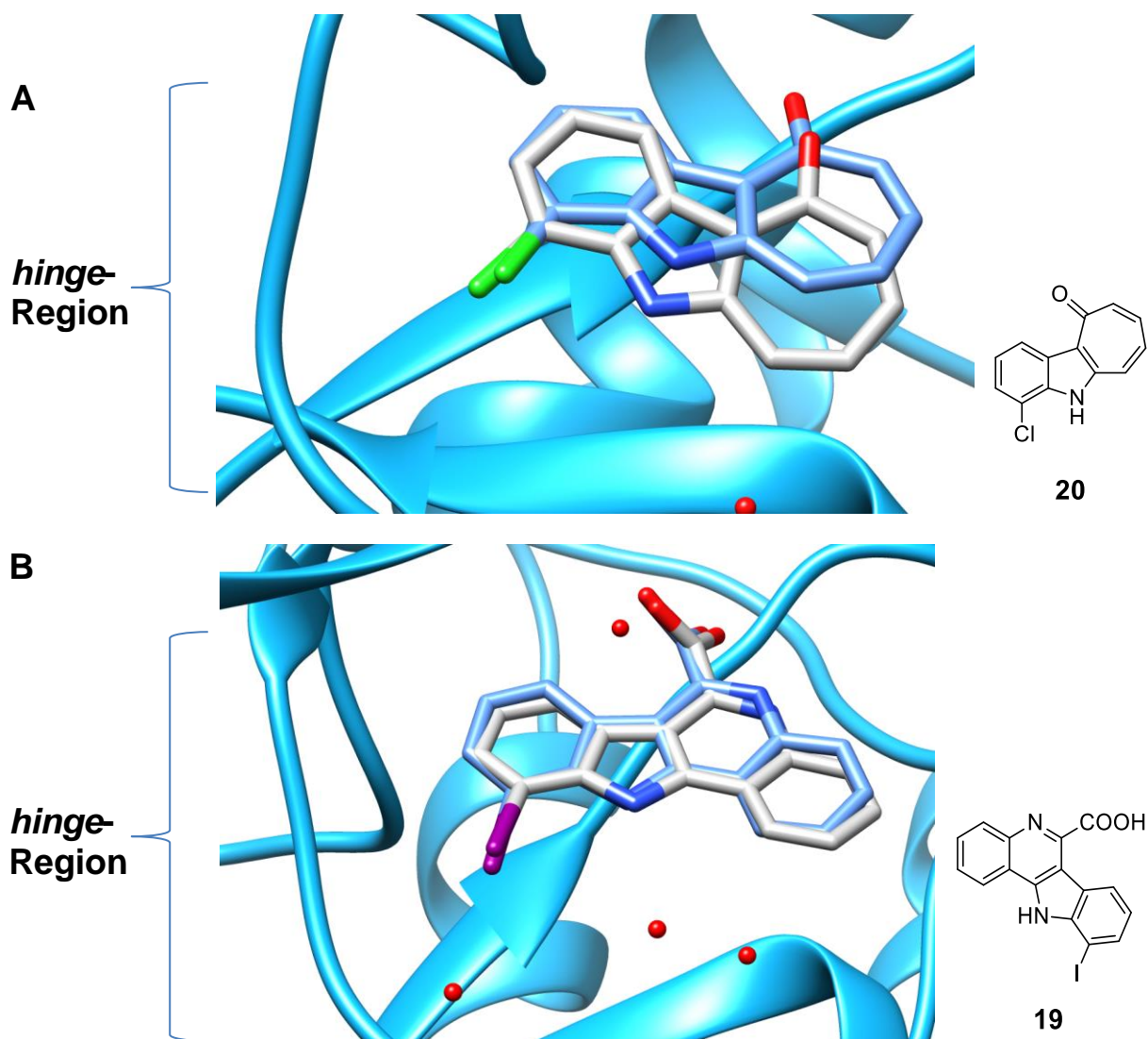


Abbildung 2-9A/B: Visualisierung der *redocking*-Posen, die den höchsten ChemScore aufwiesen. **A)** Verbindung **20** in DYRK1A (nicht publizierte Co-Kristallstruktur ^[152]) mit einem RMSD-Wert von 1.22 Å. **B)** Verbindung **19** in DYRK1A (PDB:4YLJ ^[50]) mit einem RMSD-Wert von 0.42 Å. In blau sind die *redocking*-Posen, in grau die jeweils co-kristallisierten Liganden und in cyan die entsprechende co-kristallisierte Proteinkinase DYRK1A dargestellt.

2.4 Bindemodi entwerfener Wirkstoffkandidaten

Alle im weiteren Verlauf dargestellten Bindemodi wurden in die ATP-Bindetasche der Co-Kristallstruktur von Verbindung **19** (PDB:4YLJ ^[50]) mit DYRK1A gedockt. Zunächst wurde Verbindung **21** in die ATP-Bindetasche von DYRK1A gelegt, da sie als Ausgangsverbindung dieser Arbeit diente. Während der *docking*-Analysen wurde aus den zehn unterschiedlichen Posen, die von GOLD generiert wurden, meist die Pose mit dem höchsten ChemScore ausgewählt. Wenn ähnliche Orientierungen innerhalb der der ATP-Bindetasche von DYRK1A wie für **19** und **20** gefunden wurden, wurden auch *docking*-Posen berücksichtigt, deren ChemScores nicht unter den drei höchsten scores lagen. Überwiegend befanden sich die berücksichtigten Ergebnisse unter den drei ersten scores. Alle synthetisierten Zwischenstufen sollten ebenfalls an DYRK1A getestet werden, sodass sie ebenfalls in die ATP-Bindetasche der DYRK1A gedockt wurden.

Bevor *docking*-Analysen durchgeführt wurden, wurden Protein und Ligand mit MOE (*Molecular Operating Environment* ^[154]) präpariert. Dabei wurden u. a. fehlende Seitenketten und Wasserstoffatome ergänzt. Bei den Liganden wurde bei pH 7 eine Protonierung der basischen Seitenkette vorhergesagt, sodass die protonierten Varianten für die *docking*- Versuche verwendet wurden. Da die biologischen Testungen ebenfalls in diesem pH-Bereich ausgeführt werden sollten, wurde die Protonierung als realistisch eingestuft.

Da Mannich-Basen aus Tetrahydrocarbazolonen ein Stereozentrum in Position drei aufweisen (beispielhaft Verbindung (*R/S*)-**22a**, Abbildung 2-10), wurde ein *docking*-Experiment für jedes der beiden Stereoisomere durchgeführt. Um Eutomer und Distomer identifizieren zu können, sollten nach Erhalt der biologischen Testergebnisse aktive Derivate einer Enantiomeren-Trennung unterzogen werden.

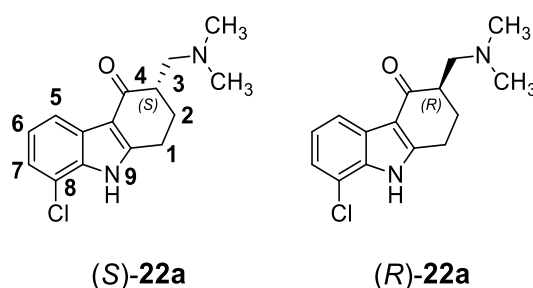


Abbildung 2-10: Darstellung beider Stereoisomere von Verbindung (*R/S*)-**22a** mit der Zuweisung von Lokanten.

2.4.1 Bindemodus von 8-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (21)

Die Imitation der Carbonsäurepartialstruktur von **19** durch die Carbonylpartialstruktur von **20** ermöglicht die elementare Wechselwirkung zum konservierten Lys188. Eine analoge Pose wurde ebenfalls bei Verbindung **21** angestrebt. In den *docking*-Experimenten konnte diese Annahme bestätigt werden. Die Carbonylpartialstruktur ist tatsächlich in ein Netzwerk von H-Brücken zwischen dem *backpocket* Wasser und Lys188 eingebettet. Verbindung **21** liegt tief in der ATP-Bindetasche der DYRK1A, was allerdings eine mögliche Halogenbindung zum Leu241 unwahrscheinlich macht. (Distanz: 4.8 Å, σ -hole-Winkel: 148°, Abbildung 2-11).

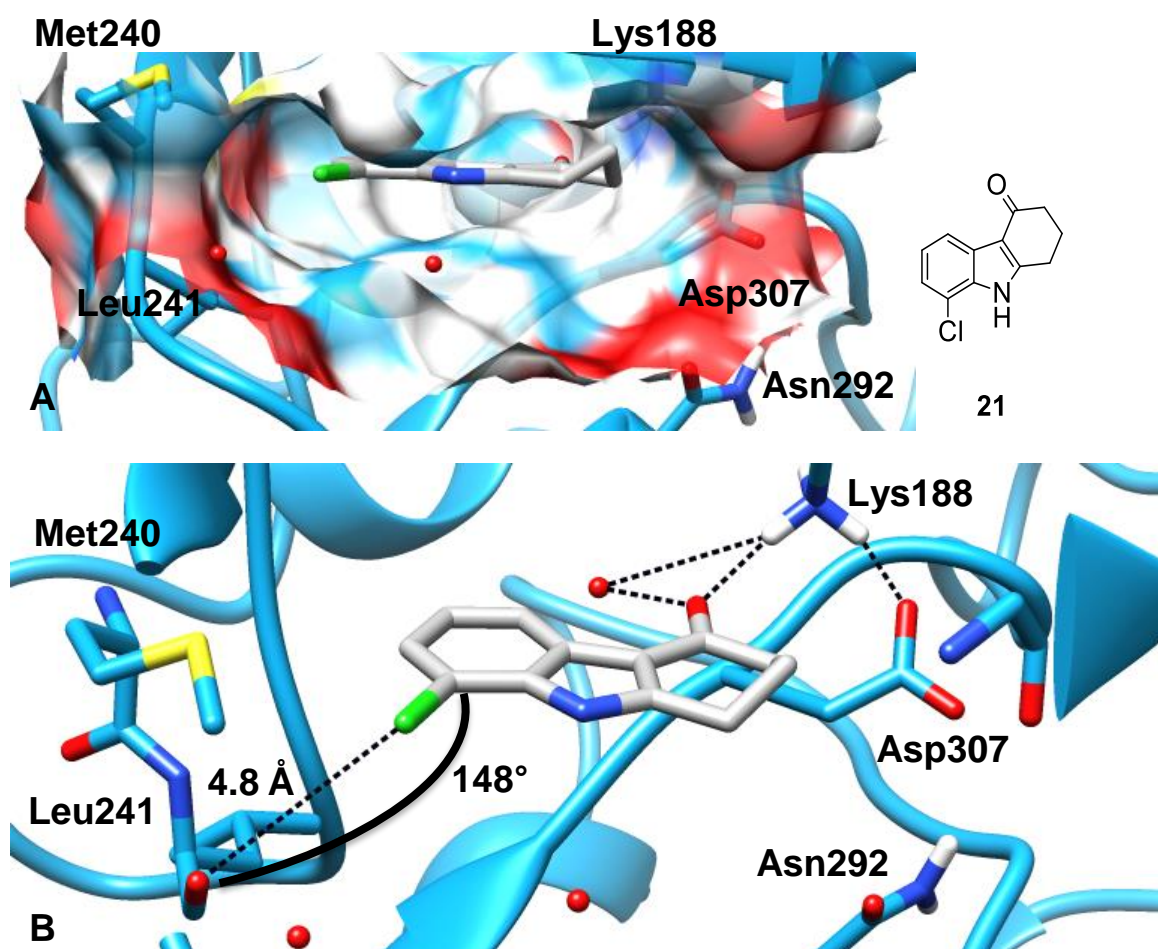


Abbildung 2-11: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten mit der Ausgangsverbindung **21** (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ^[50]). **A)** Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. **B)** Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Der σ -hole-Winkel einer hypothetischen Halogenbindung wurde durch eine gebogene schwarze Linie dargestellt. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

2.4.2 Bindemodi von Mannich-Basen des 8-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-ons

(S)-8-Chlor-3-[(dimethylamino)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-on [(S)-**22a**] konnte die erwarteten Ergebnisse während der *docking*-Experimente mit höchstem ChemScore liefern (Abbildung 2-12). Die Lage in der Bindetasche ist aufgrund der voluminöseren Seitenkette weniger tief als bei **20**. Während die Carbonylpartialstruktur weiterhin mit dem konservierten Lys188 im hinteren der Teil der Bindetasche interagierte, zeigten die geometrischen Eigenschaften einer möglichen Halogenbindung zu Leu241 eine Verbesserung im Vergleich zur *docking*-Pose von **21** (Distanz: 4.3 Å, σ -hole-Winkel: 160°). Vielversprechend war eine zusätzliche H-Brücke der basischen Partialstruktur zur Seitenkette von Asn292 im vorderen Bereich der Bindetasche. Das Indolstickstoffwasserstoffatom zeigte außerdem eine H-Brücke zu einem Wassermolekül im vorderen Bereich der ATP-Bindetasche.

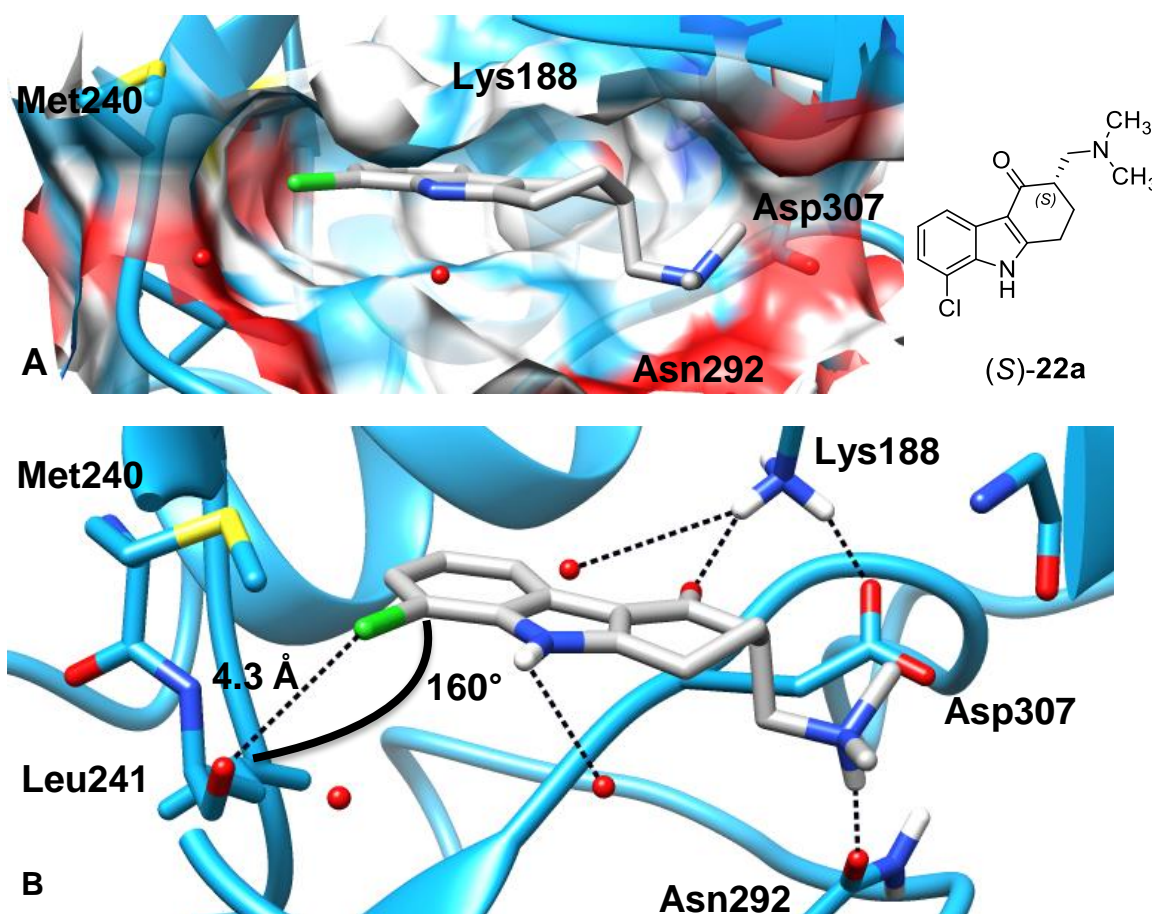


Abbildung 2-12: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten mit (S)-**22a** (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ^[50]). **A)** Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. **B)** Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Der σ -hole-Winkel einer hypothetischen Halogenbindung wurde durch eine gebogene schwarze Linie dargestellt. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

(*R*)-8-Chlor-3-[(dimethylamino)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on [(*R*)-**22a**] zeigte bei den *docking*-Experimenten eine 180°-Drehung um die Längsachse der drei Ringsysteme innerhalb der ATP-Bindetasche von DYRK1A. So konnten zwar die Wechselwirkungen mit Lys188 und Asn292 gefunden werden, aber eine mögliche Halogenbindung zur *hinge*-Region konnte nicht mehr formuliert werden. Eine zusätzliche H-Brücke konnte zwischen der Carbonylfunktionalität und einem Wassermolekül im vorderen Teil der ATP-Bindetasche festgestellt werden (Abbildung 2-13). Aufgrund der großen Oberfläche des Chloratoms konnte ein *clash* mit der Proteinoberfläche der Proteinkinase beobachtet werden, was unvorteilhaft für eine Wechselwirkung ist, aber aufgrund der Flexibilität des Liganden und des Proteins doch möglich sein könnte.

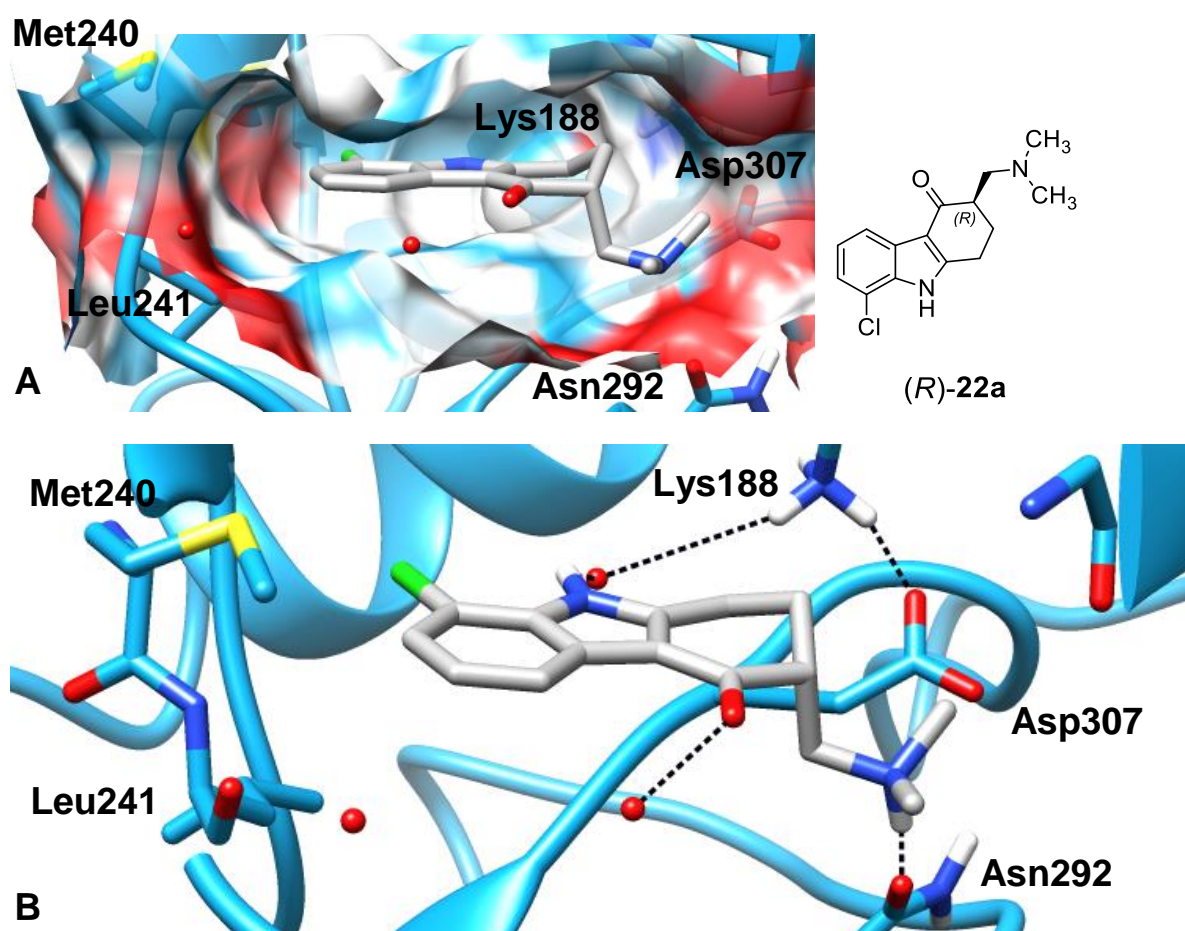


Abbildung 2-13: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten mit (*R*)-**22** (grau) in der Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ ^[50]). **A**) Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. **B**) Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

(S)-8-Chlor-3-(piperidin-1-ylmethyl)-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on [(S)-**22b**] zeigte wie das Dimethylamin-Analogon **22a** H-Brücken zwischen Lys188, Asn292 und dem *backpocket*-Wassermolekül. Auch eine potentielle Halogenbindung zwischen dem Chlor-Substituenten und Leu241 wurde gefunden (Distanz: 4.3 Å, σ -hole-Winkel: 152°). Zwischen dem Indolstickstoffwasserstoffatom und einem Wassermolekül wurde ebenfalls eine H-Brücke gefunden. Die Lage innerhalb der ATP-Bindetasche war mit der von (S)-**22a** zu vergleichen. Das Wassermolekül im hinteren Bereich der Bindetasche wechselwirkte in einem H-Brückennetzwerk wieder direkt mit der Carbonylpartialstruktur (Abbildung 2-14).

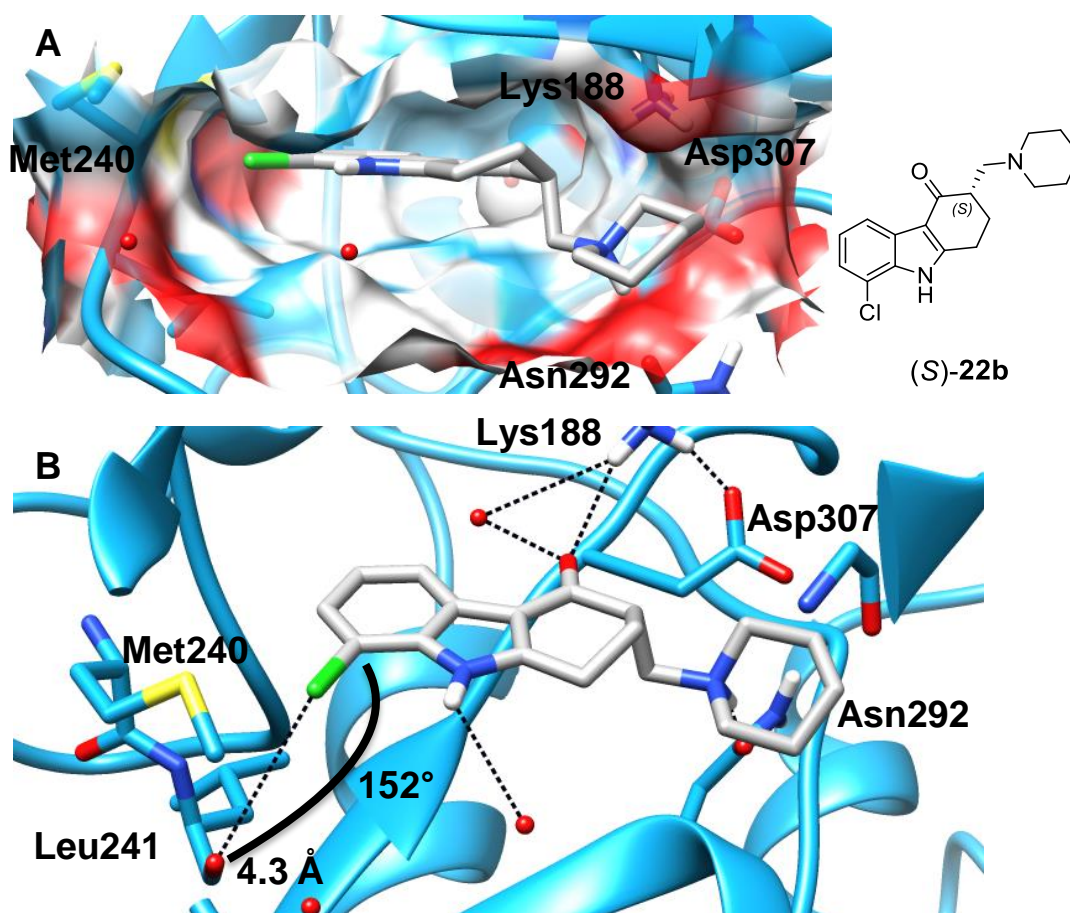


Abbildung 2-14: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten mit (S)-**22** (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ^[50]). **A)** Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. **B)** Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Der σ -hole-Winkel einer hypothetischen Halogenbindung wurde durch eine gebogene schwarze Linie dargestellt. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

(R)-8-Chlor-3-(piperidin-1-ylmethyl)-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on [(R)-**22b**] hingegen zeigte wie (R)-**22a** eine H-Brücke zwischen dem Carbonylsauerstoffatom, Asn292 und dem Wassermolekül im vorderen Bereich der Bindetasche. Eine potentielle Halogenbindung zur *hinge*-Region konnte nicht formuliert werden. Erneut konnte, wie bei (R)-**22a**, ein *clash* des Chlor-Substituenten mit der Proteinoberfläche beobachtet werden. Die Lage innerhalb der ATP-Bindetasche war mit der von (R)-**22a** zu vergleichen. (Abbildung 2-15).

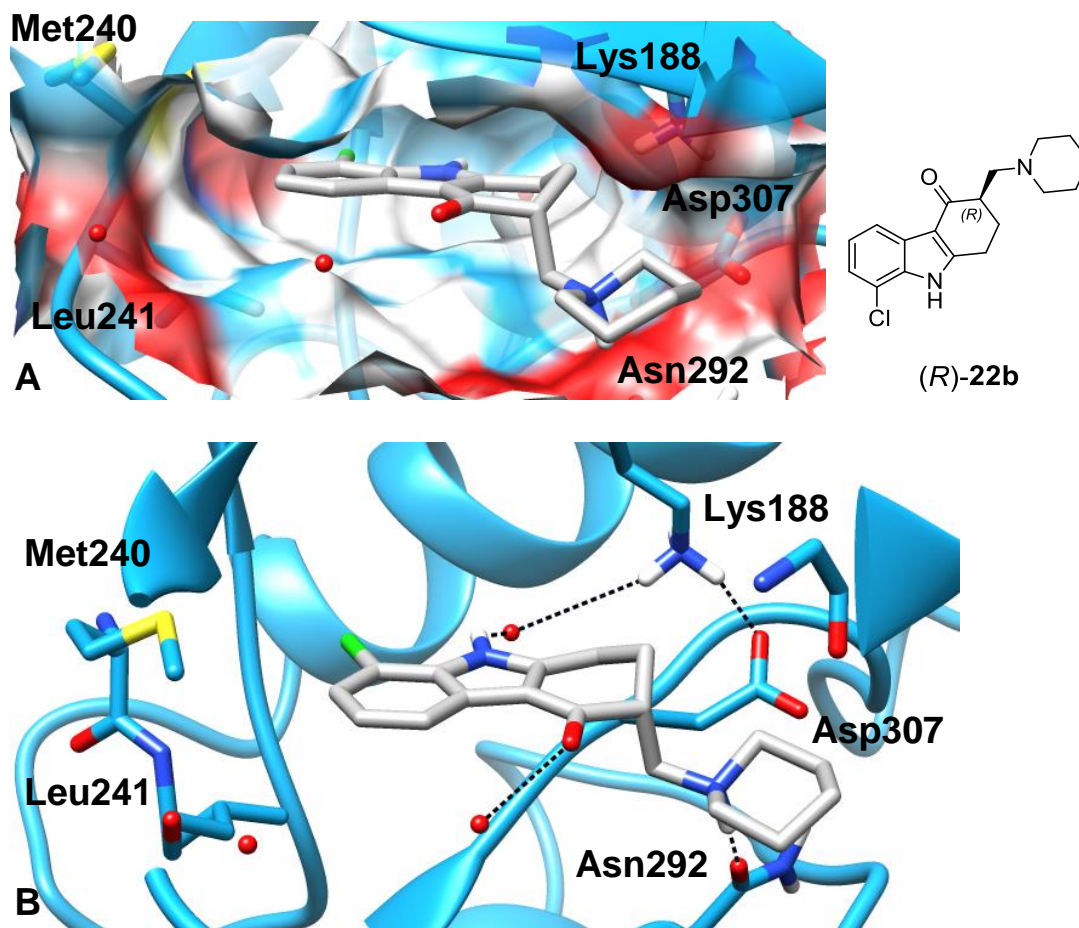


Abbildung 2-15: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten mit (R)-**22b** (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ^[50]). **A)** Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. **B)** Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

Bei entsprechenden docking-Experimenten mit (*R/S*)-8-Chlor-3-[(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on [(*R/S*)-**22c**] wurde eine völlig neue Interaktion zum *backbone* von Lys167 der ATP-Bindetasche beobachtet. Im Gegensatz zu den bereits gezeigten Beispielen konnte keine *docking*-Pose mit der Orientierung von **21** in Einklang gebracht werden. Bei beiden Stereoisomeren wurde eine 180°-Drehung (bezogen auf die Längsachse, die durch die drei Ringsysteme gebildet wird) in der ATP-Bindetasche beobachtet. Die Seitenkette mit dem 2-Methylimidazol-Rest der Verbindung (*R/S*)-**22c** bildete in beiden Fällen eine H-Brücke zum *backbone* von Lys167. Diese vielversprechende Wechselwirkung wurde im weiteren Verlauf der *docking*-Experimente weiter untersucht. Beispielhaft soll diese Interaktion an (*S*)-**22c** gezeigt werden (Abbildung 2-16). Der Chlor-Substituent ergab erneut einen *clash* mit der Proteinoberfläche.

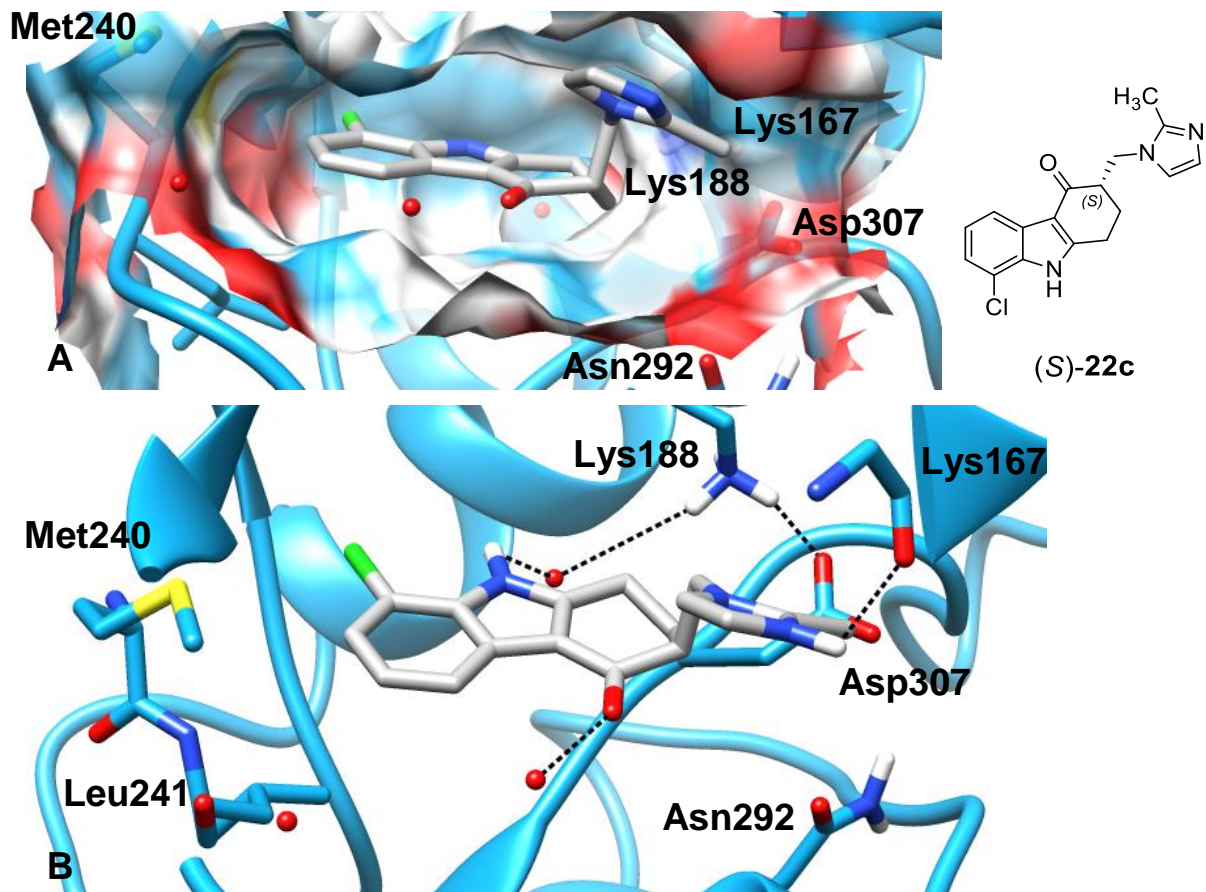


Abbildung 2-16: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten mit (*S*)-**22c** (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ^[50]). **A)** Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. **B)** Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

2.4.3 Bindemodi von Mannich-Basen des 6-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-ons

Aufgrund des häufig beobachteten 180°-*flips* der Verbindungen mit einem Chlor-Substituenten in Position 8 sollten analoge Verbindungen synthetisiert werden, die einen Chlor-Substituenten in Position 6 tragen. Eine potentielle Halogenbindung zu Leu241 sollte so in der alternativen gedrehten Orientierung wiederhergestellt werden. Zusätzlich wurde bei solchen Strukturen eine H-Brücke zwischen dem Indolstickstoffwasserstoffatom und Lys188 sowie dem *backpocket*-Wassermolekül erwartet. Durch die verschiedenen basischen Seitenketten sollten zusätzliche H-Brücken zur Proteinoberfläche (Lys167 und Asn292) erhalten werden.

Die *docking*-Ergebnisse bestätigten in der Tat die vermuteten Bindemodi der 6-Chlor-Verbindungen. Die Ergebnisse zeigten erwartungsgemäß ebenfalls einen 180°-*flip* in der ATP-Bindetasche, die vergleichbare Interaktionen zu den 8-Chlor-Derivaten zeigten. Deshalb werden in diesem Abschnitt die *docking*-Ergebnisse vorgestellt, bei denen der Chlor-Substituent in 6-Position zum Leu241 orientiert ist. Bei *docking*-Experimenten zeigte (*R*)-6-Chlor-3-[(dimethylamino)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-on [(*R*)-**26a**] erneut H-Brücken zu Wassermolekülen in der ATP-Bindetasche, die durch das Carbonylsauerstoffatom und das Indolstickstoffwasserstoffatom vermittelt wurden. Während sich wieder eine H-Brücke zum Asn292 ausbildete, zeigte sich erwartungsgemäß eine potentielle Halogenbindung zum *backbone* von Leu241. Im Vergleich zu voranstehend beschriebenen Verbindungen mit 8-Chlor-Substituenten waren die geometrischen Voraussetzungen für eine hypothetische Halogenbindung zu Leu241 verbessert, da vor allem die Entfernung reduziert wurde (Distanz: 3.2 Å, *σ-hole*-Winkel: 158°). Daher lag die Verbindung auch weniger tief in der ATP-Bindetasche (Abbildung 2-17).

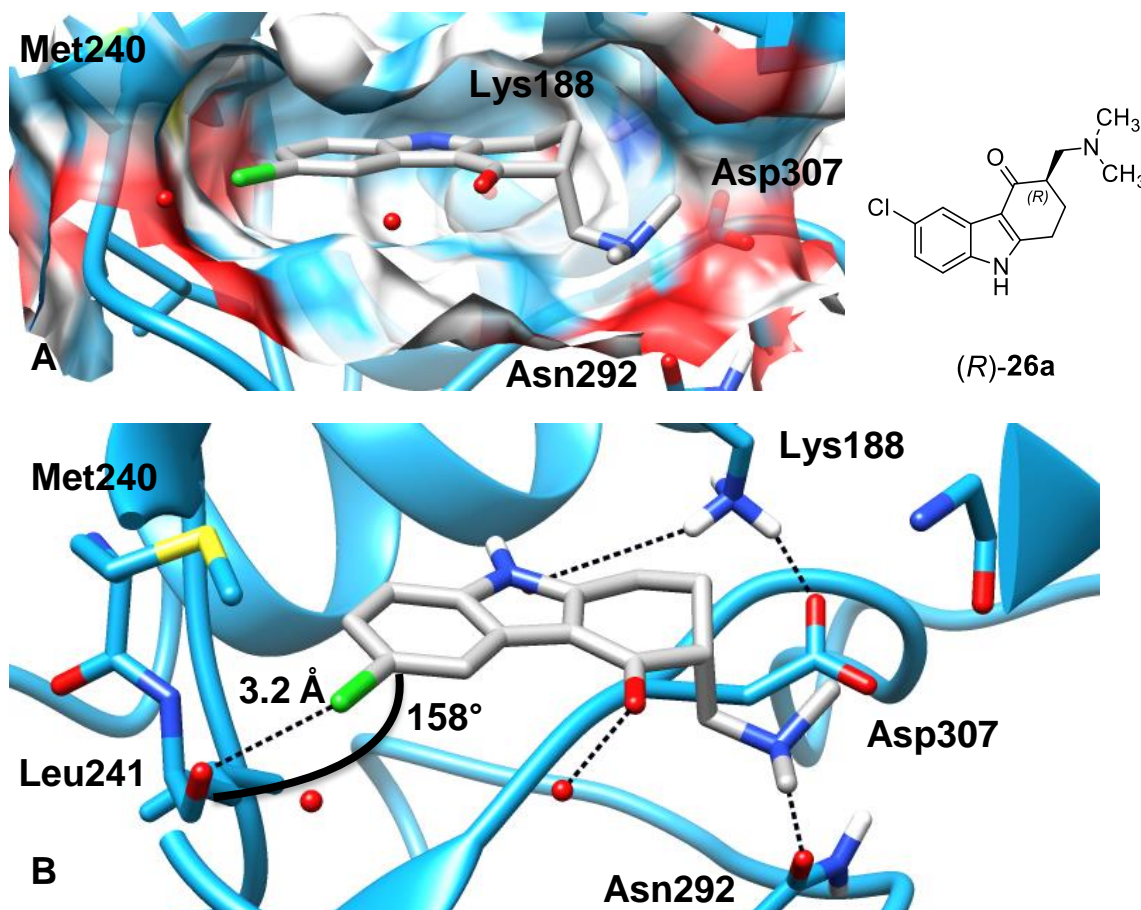


Abbildung 2-17: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten mit *(R)*-26a (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ^[50]). **A)** Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. **B)** Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Der σ -hole-Winkel einer hypothetischen Halogenbindung wurde durch eine gebogene schwarze Linie dargestellt. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

Gleichartige Interaktionen konnten für *(R)*-6-Chlor-3-(piperidin-1-ylmethyl)-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on [(*R*)-26b] gefunden werden. Auch hier wurde eine potentielle Halogenbindung zum Leu241 der hinge-Region von DYRK1A beobachtet (Distanz: 3.3 Å, σ -hole-Winkel: 159°) (Abbildung 2-18).

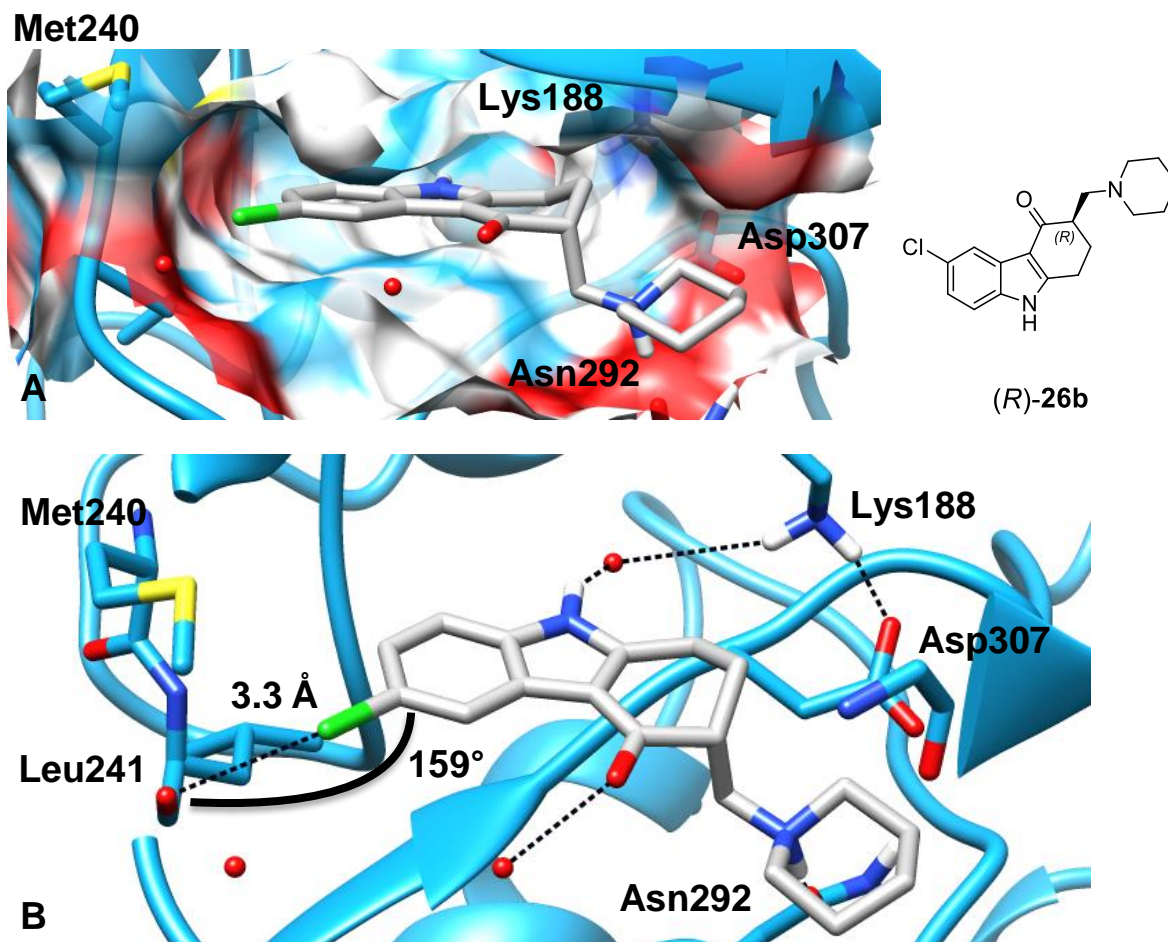


Abbildung 2-18: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten mit (R)-**26b** (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ^[50]). **A)** Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. **B)** Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Der σ -hole-Winkel einer hypothetischen Halogenbindung wurde durch eine gebogene schwarze Linie dargestellt. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

Bei (S)-6-Chlor-3-[(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on [(S)-**26c**] konnte erneut die H-Brücke zu Lys167 vorhergesagt werden. Eine potentielle Halogenbindung zu Leu241 mit verbesserten geometrischen Eigenschaften (Distanz: 3.8 Å, σ -hole-Winkel: 161°) wurde ebenfalls beobachtet (Abbildung 2-19). Bei anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten analogen Verbindungen zeigten häufig die *R*-konfigurierten Derivate diese Orientierung innerhalb der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Da das 2-Methylimidazol jedoch mit dem oberen Teil der Bindetasche interagiert, trat diese eigentlich für *R*-konfigurierte Verbindungen typische *docking*-Pose auch bei (S)-**26c** auf.

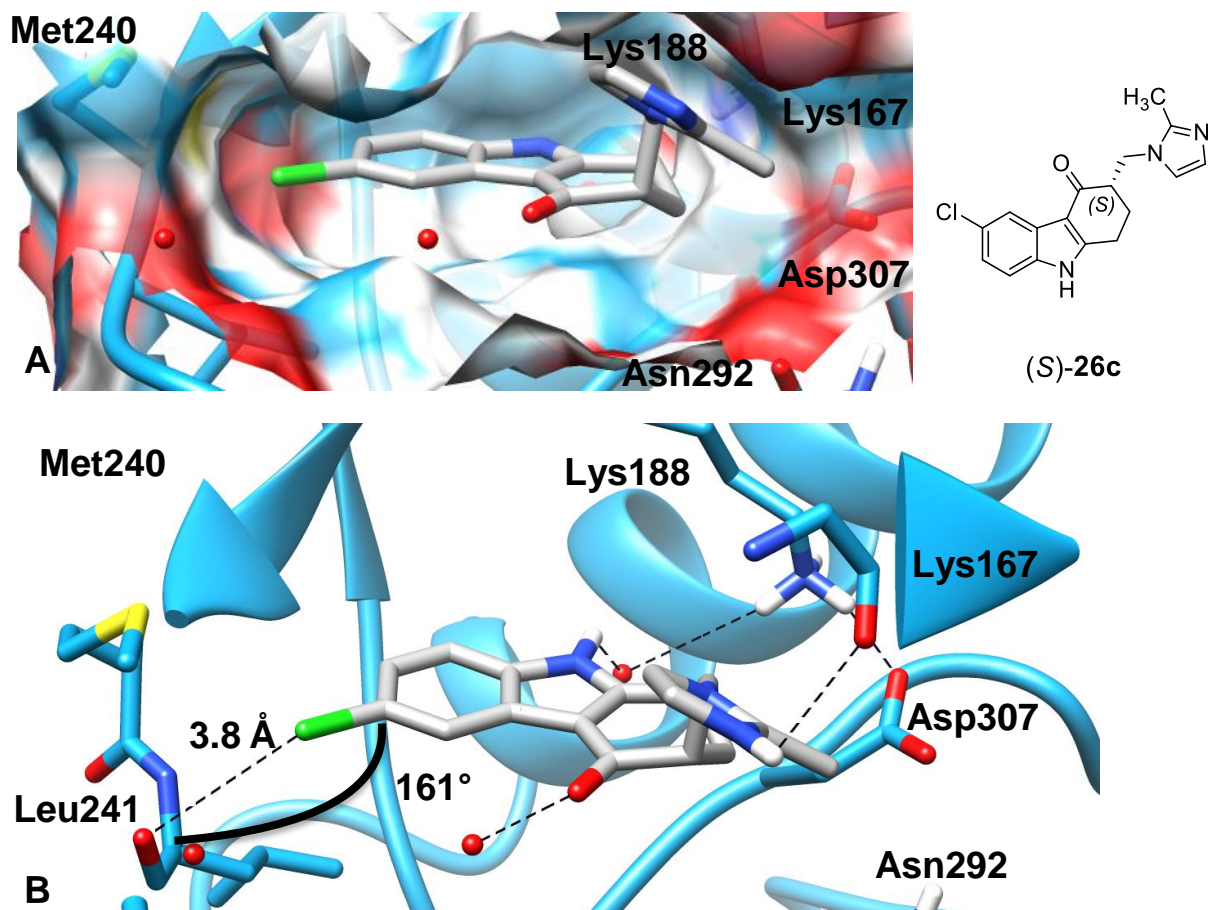


Abbildung 2-19: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten (S)-26c (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ^[50]). **A)** Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. **B)** Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Der σ -hole-Winkel einer hypothetischen Halogenbindung wurde durch eine gebogene schwarze Linie dargestellt. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

2.4.4 Ausgewählte Bindemodi von Mannich-Basen des 1,2,3,9-Tetrahydro-4H-carbazol-4-ons

Um den Einfluss des Chlor-Substituenten zu untersuchen, wurden alle neu entworfenen Mannich-Basen auch ohne dieses Element in *docking*-Experimenten untersucht. Für alle *docking*-Studien zeigten sich dabei ähnliche Ergebnisse wie für die Verbindungen der Klassen **22** und **26**. Interessanterweise wurden für die Verbindungen ohne Chlorsubstitution ausschließlich die im Vergleich zu (S)-**22a** um 180° gedrehte Pose unter den drei höchsten ChemScores gefunden. Da der Chlor-Substituent nun nicht mehr zu einem *clash* mit der Proteinoberfläche führt, bevorzugt GOLD vermutlich diese *docking*-Posen. Da sich dieses Phänomen für alle *docking*-Experimente reproduzieren ließ, wurden beispielhaft in diesem Kapitel die detaillierten Interaktionen von (R/S)-3-[(Dimethylamino)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-on [(R/S)-**27a**] dargestellt. Während das Indolstickstoffwasserstoffatom wieder mit einem Wassermolekül im hinteren Bereich der Bindetasche eine H-Brücke bildete, zeigte die Carbonylfunktionalität wieder eine Wechselwirkung mit dem Wassermolekül im vorderen Bereich der ATP-Bindetasche. Die zusätzliche H-Brücke zu Asn292 wurde von GOLD für (R)-**27a** erneut vorhergesagt. Für (S)-**27a** wurde diese Interaktion nicht gefunden, da die basische Seitenkette in ein H-Brücken-Netzwerk mit dem Carbonylsauerstoffatom involviert war [(R)-**27a**, Abbildung 2-20; (S)-**27a** Abbildung 2-21].

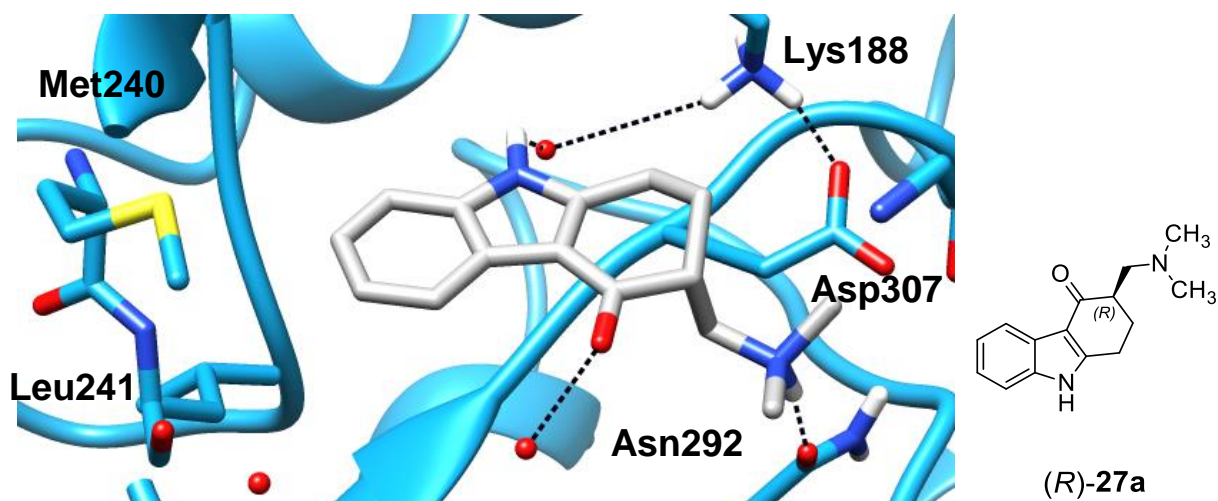


Abbildung 2-20: Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ ^[50]) mit (R)-**27a** (grau). Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

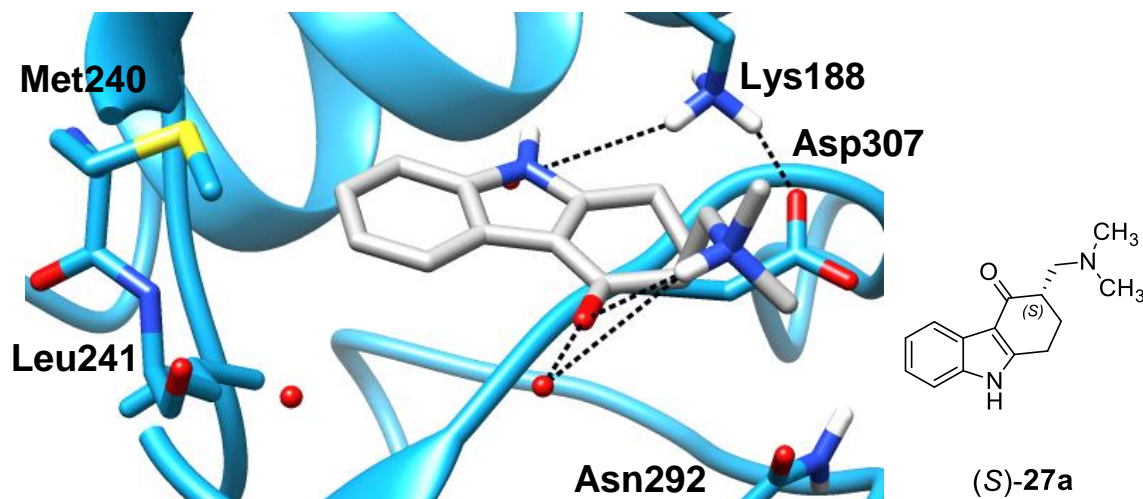
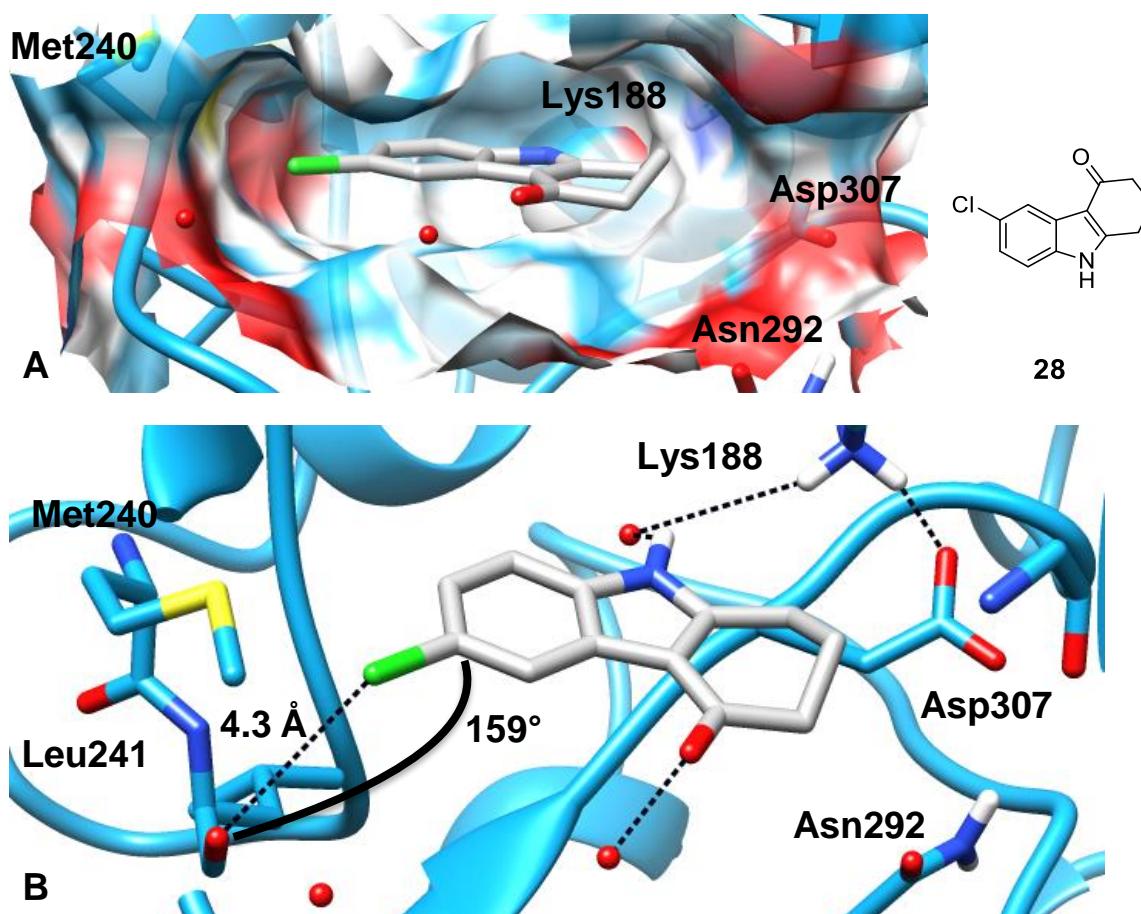


Abbildung 2-21: Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ ^[50]) mit (S)-27a (grau). Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

2.4.5 Bindemodus von 6-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-on

Während die Carbonylsauerstofffunktion und der Chlor-Substituent in Position 8 bei Verbindung **20** sich bezogen auf die Längsachse des Systems an drei Ringen gegenüberstehen, weist 6-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-on (**28**) beide wichtigen Merkmale auf einer Seite des Moleküls auf. Daher wurden in *docking*-Experimenten überwiegend Posen gefunden, die eine Orientierung zum vorderen Teil der ATP-Bindetasche vorhersagten. Das Indolstickstoffwasserstoffatom interagierte dabei mit einem Wassermolekül im hinteren Bereich der ATP-Bindetasche, das eine vermittelte H-Brücke zu Lys188 aufbaute. Der Chlor-Substituent in 6-Position war in Richtung von Leu241 orientiert. Damit wurde eine Halogenbindung ermöglicht (Distanz: 4.3 Å, σ -hole-Winkel: 158°). Das Carbonylsauerstoffatom bildete eine H-Brücke zu einem Wassermolekül am Eingang der ATP-Bindetasche (Abbildung 2-22).



2.4.6 Bindemodi der 3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-one

Im Verlauf der Synthese der entsprechenden Mannich-Basen wurden 3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-one als Zwischenstufen isoliert. Da diese Substanzen strukturelle Ähnlichkeit zu den Leitstrukturen **19**, **20** und **21** aufweisen, wurden sie ebenfalls in *docking*-Experimenten untersucht. Aufgrund der enthaltenen PAIN-Struktur (α,β -ungesättigtes Keton) sollten Ergebnisse aus den enzymatischen *in vitro*-Testungen mit diesen Verbindungen mit Vorsicht betrachtet werden.

8-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**29**) lag wie **21** tief in der ATP-Bindetasche und zeigte äquivalente Interaktionen mit der Proteinoberfläche. Auffällig war jedoch eine wasservermittelte Halogenbindung zu Leu241 der *hinge*-Region mit hervorragenden geometrischen Eigenschaften (Distanz: 3.6 Å, σ -hole-Winkel: 172°) (Abbildung 2-23).

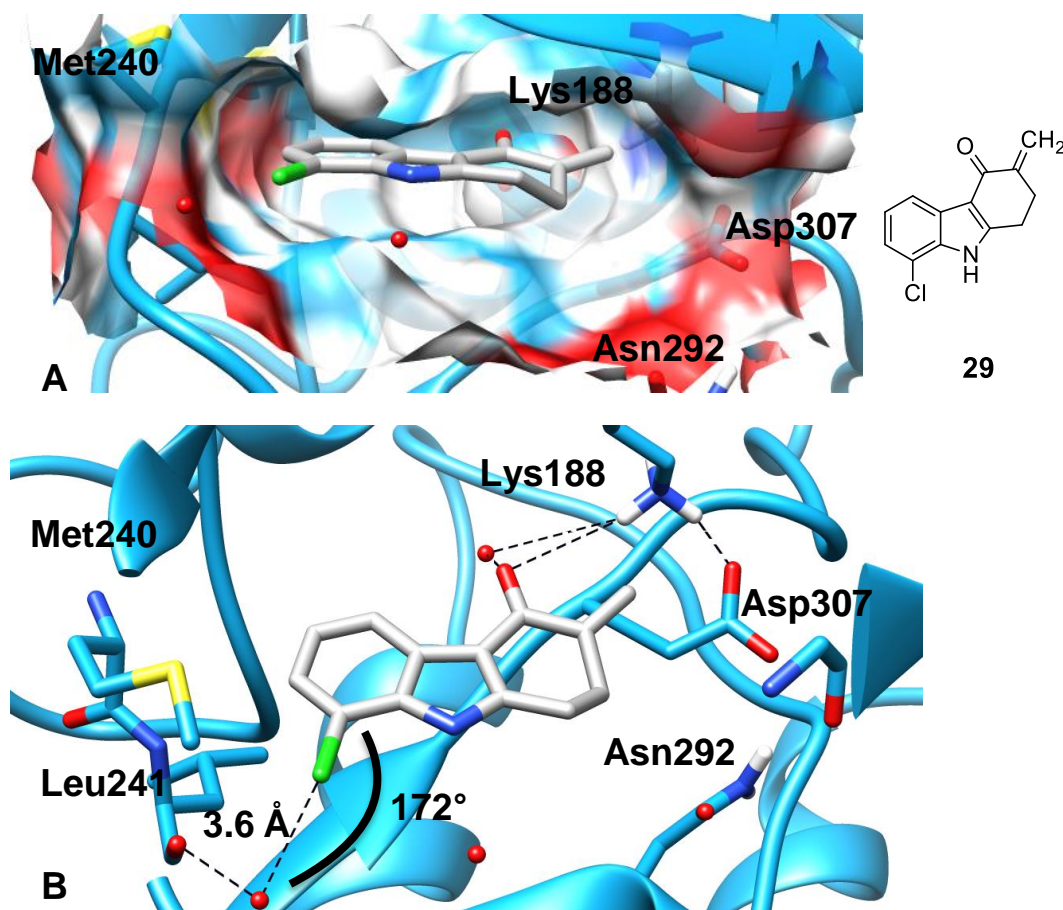


Abbildung 2-23: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten mit **29** (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ ^[50]). **A)** Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. **B)** Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Der σ -hole-Winkel einer hypothetischen Halogenbindung wurde durch eine gebogene schwarze Linie dargestellt. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

6-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**30**) lag wie **28** weniger tief in der ATP-Bindetasche und zeigte äquivalente Interaktionen mit der Proteinoberfläche. Die direkte hypothetische Halogenbindung zu Leu241 (Distanz: 4.5 Å, σ -hole-Winkel: 157°) zeigte vergleichbare geometrische Eigenschaften zu **28** (Abbildung 2-24).

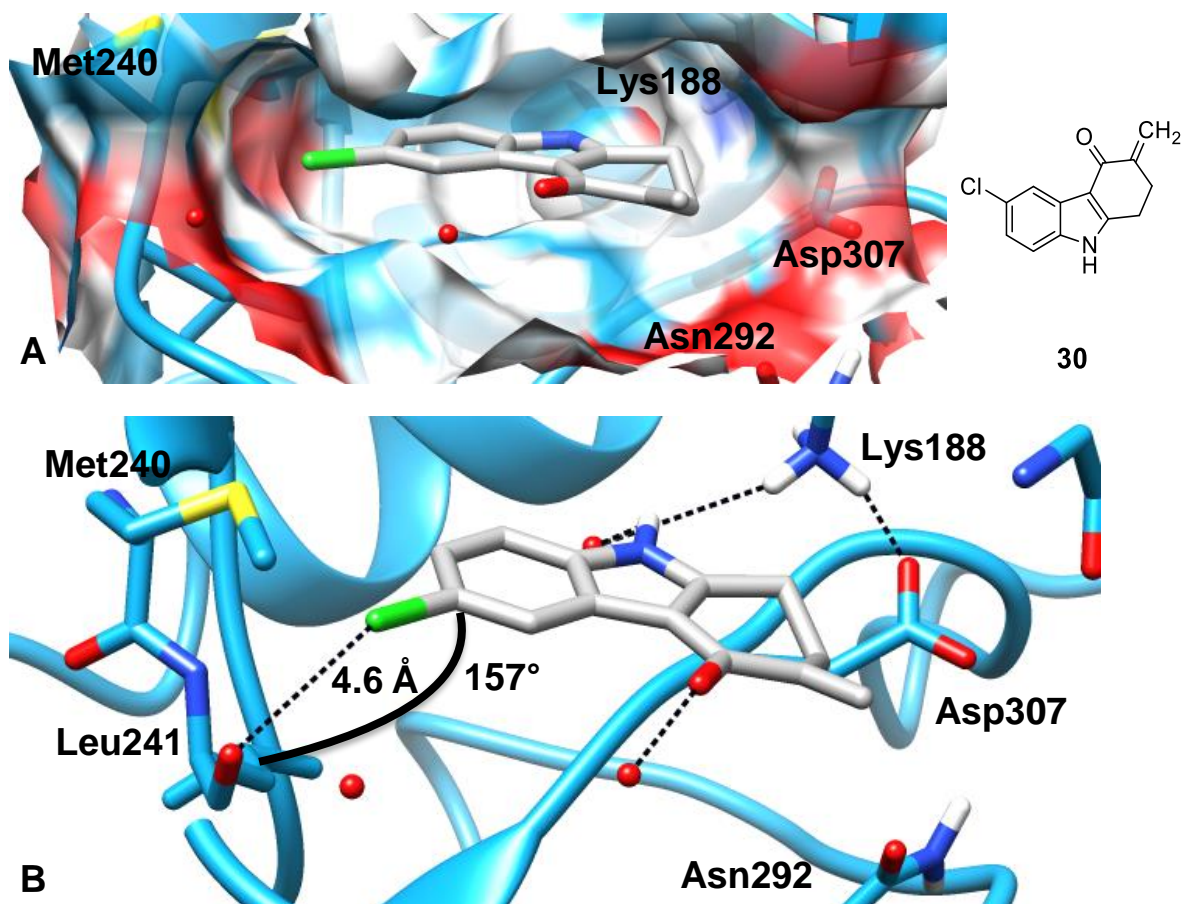


Abbildung 2-24: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten mit **30** (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ^[50]). **A**) Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche. In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff dargestellt. **B**) Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Der σ -hole-Winkel einer hypothetischen Halogenbindung wurde durch eine gebogene schwarze Linie dargestellt. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

Docking-Analysen mit 3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**31**, Abbildung 2-25) lieferte eine ähnliche Pose im Vergleich zu Verbindung **30** und wurde daher nicht dargestellt.

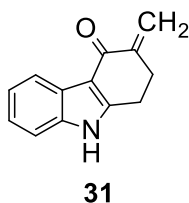


Abbildung 2-25: Struktur der Verbindung **31**.

2.4.7 Bindemodus von 2-(4-Oxo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-3-yl)acetonitril

Da sich 3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-one als Ausgangsverbindungen für die Synthese von entsprechenden Acetonitrilen eignen, wurde 2-(4-Oxo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-3-yl)acetonitril [(*R/S*)-**32**] in *docking*-Versuchen untersucht. Das Nitril sollte als Ausgangsverbindung für weitere chemische Abwandlungen fungieren. Beide Stereoisomere zeigten eine im Vergleich zu (*S*)-**22a** um 180° gedrehte Pose, da sich eine H-Brücke zwischen der Nitrilgruppe und dem *backbone* von Lys167 ausgebildet hatte. Das Indolstickstoffwasserstoffatom ist zum *backpocket*-Wassermolekül orientiert. Das Carbonylsauerstoffatom interagiert mit einem Wassermolekül im vorderen Bereich der Bindetasche (Abbildung 2-26). Beide Stereoisomere zeigten diese Orientierung der Carbonylfunktion. Eine Interaktion zur *hinge*-Region wurde nicht gefunden.

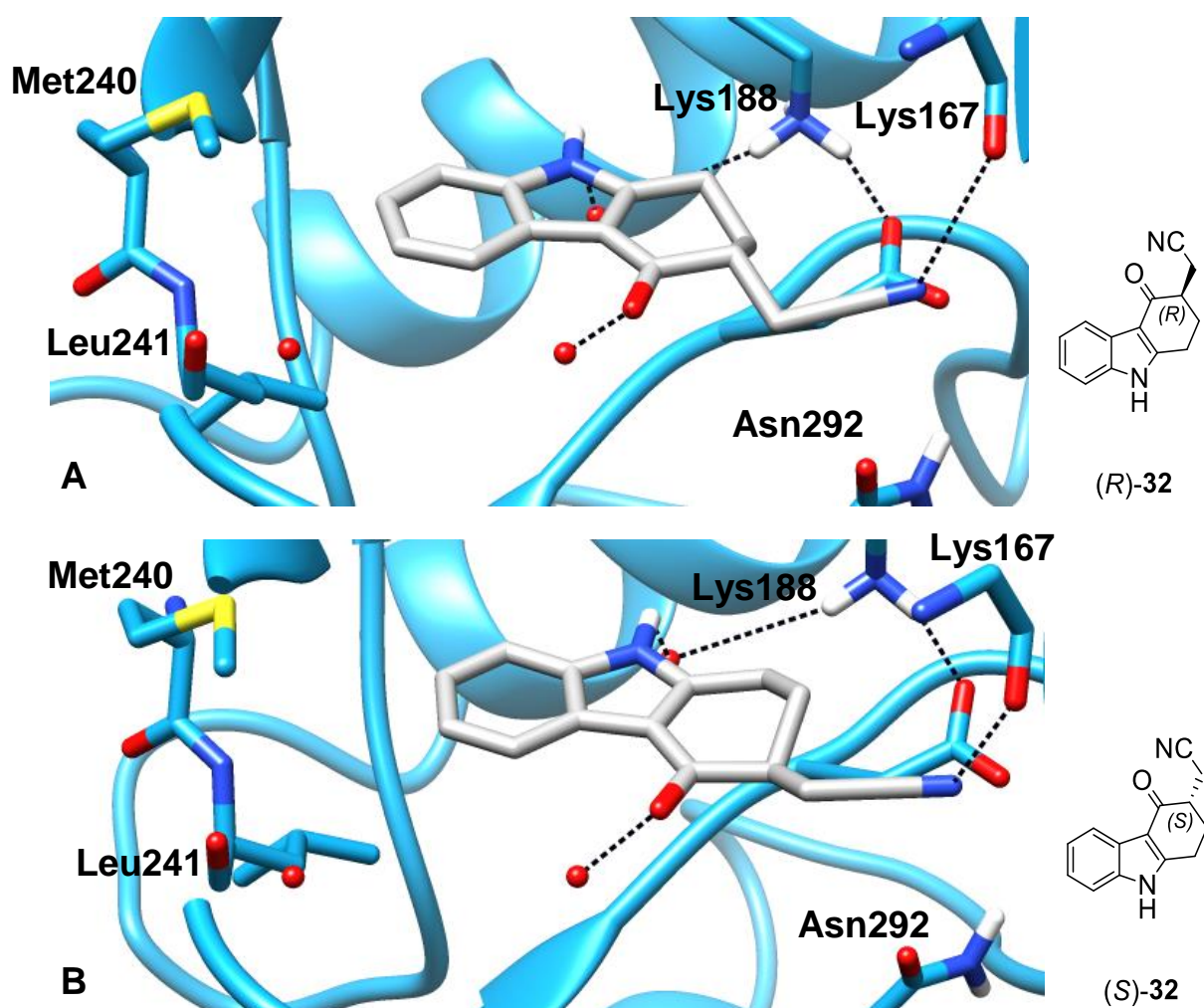


Abbildung 2-26: Bindemodi von (*R*)-**32** und (*S*)-**32** (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ [50]). A+B) Detaillierte Darstellung der docking-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

2.4.8 Docking in die verwandte Proteinkinase CLK1

Durch das Design des 4-Hydroxypiperidin-Derivats **22e** wurde ein zusätzlicher Wasserstoffbrückendonator in das Molekül eingebaut. In *docking*-Experimenten mit (S)-**22e** in der Proteinkinase CLK1 (PDB:1Z57 ^[111]) konnte eine potentielle Wechselwirkung mit dem *gatekeeper* Phe241 und einer Asparaginsäure (Asp250) am Eingang der ATP-Bindetasche beobachtet werden. Aus diesem Grund werden hier die Ergebnisse aus *docking*-Versuchen mit Verbindung (S)-**22e** in CLK1 dargestellt und mit den experimentell ermittelten *docking*-Posen in DYRK1A verglichen (Abbildung 2-27).

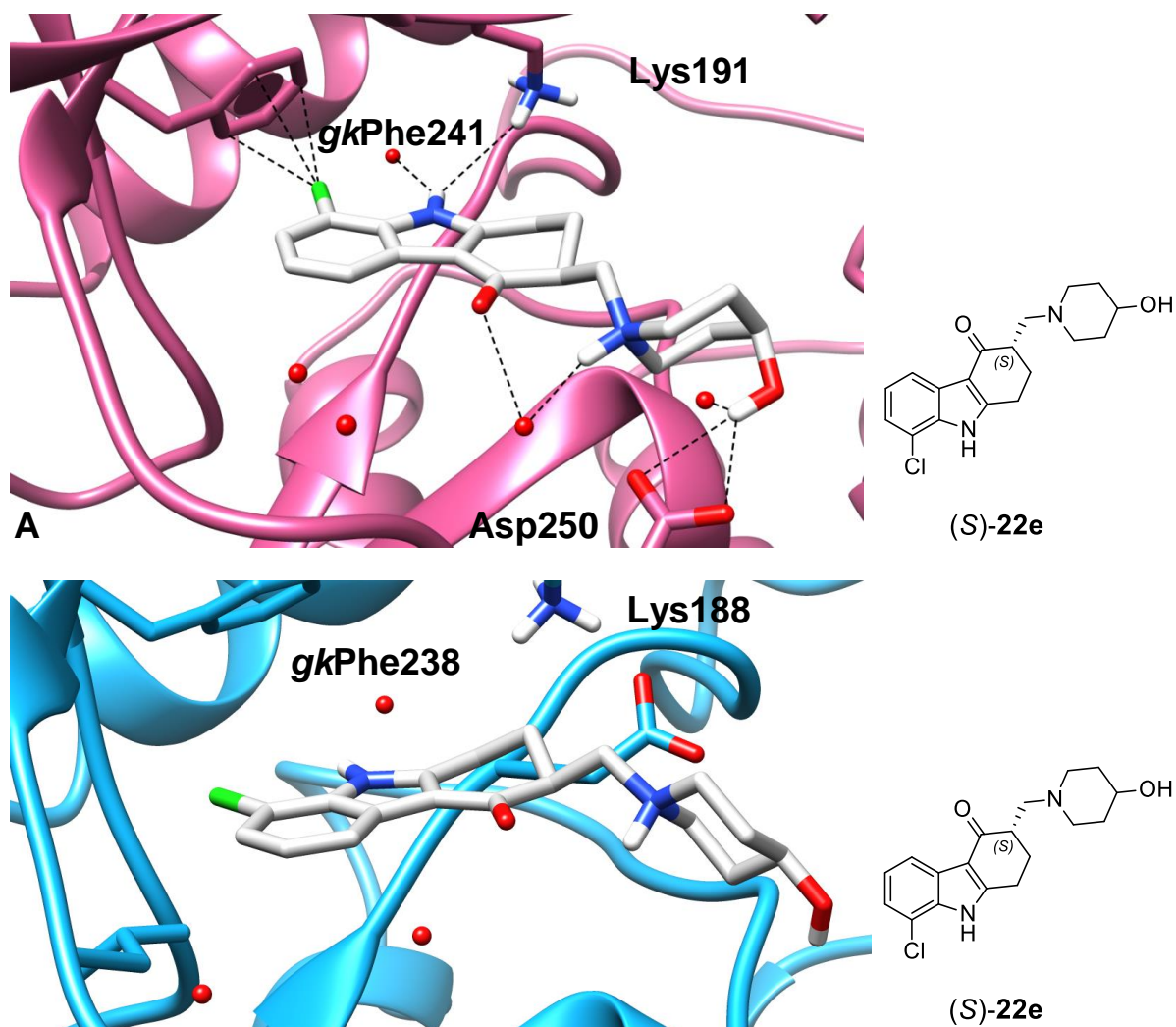


Abbildung 2-27: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten mit (S)-**22e** (grau) in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ ^[50]) und CLK1 (magenta, PDB:1Z57 ^[111]). A) Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von CLK1. B) Detaillierte Darstellung der *docking*-Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

Während in beiden *docking*-Experimenten keine Interaktionen mit der *hinge*-Region festgestellt wurden, zeigte sich bei den *docking*-Untersuchungen in der CLK1 eine interessante Wechselwirkung zu einem Aspartat (Asp250) im vorderen Teil der Bindetasche. Diese Interaktion wurde in den äquivalenten *docking*-Analysen mit DYRK1A nicht beobachtet. Durch die Einbettung in ein Wasserstoffbrückennetzwerk zusammen mit der Carbonylpartialstruktur scheint ein 4-Hydroxypiperidin-Substituent bestens geeignet für eine CLK1-Inhibition zu sein. Ein weiterer Aspekt ist bei dieser Verbindung eine potentielle Halogenbindung zum π -Elektronen-System des Phenylrings des *gatekeepers* (Phe241). Der Abstand zwischen dem *gatekeeper* und dem Chloratom liegt für die ausgewählte *docking*-Pose bei 3.3–3.5 Å, was eine Wechselwirkung beider Partner wahrscheinlicher macht. Eine analoge Orientierung des Chlor-Atoms von (S)-**22e** zum Phenylring des *gatekeepers* wie bei CLK1 konnte für die in DYRK1A vorgenommenen Untersuchungen nicht gefunden werden. Die Verbindung zeigt in der ATP-Bindetasche von DYRK1A eine deutlich veränderte Orientierung. Keine Pose, die in den *docking*-Experimenten mit (S)-**22e** an DYRK1A und CLK1 gefunden wurde, zeigte eine ähnliche Orientierung des Liganden in beiden ATP-Bindetaschen. Durch zusätzliche Adressierung der *hinge*-Region mit einem zusätzlichen Halogensubstituenten zur Ausbildung einer Halogenbindung zur *hinge*-Region oder einem H-Brückendonator könnte eine potentielle inhibitorische Aktivität der Verbindung vermutlich gesteigert werden.

2.5 Schlussfolgerungen

Aufgrund der variantenreichen Posen, die von GOLD generiert wurden, konnten interessante potentielle Wechselwirkungen zu Strukturelementen in der ATP-Bindetasche der Proteinkinase DYRK1A aufgedeckt werden. Das Auftreten zweier Stereoisomere Verbindungen im Zusammenhang mit der hohen Flexibilität der Moleküle führte zu schwer interpretierbaren Ergebnissen. Nichtsdestotrotz waren die Resultate vielversprechend. Eine endgültige Einschätzung der bei den *docking*-Analysen gemachten Beobachtungen konnte daher nur durch eine *in vitro* Testung an der DYRK1A selbst bestätigt werden. Aus diesem Grund fiel der Entschluss, alle designten Wirkstoffkandidaten zu synthetisieren und an DYRK1A zu testen. Bei einem positiven Testergebnis sollte eine Trennung der einzelnen Enantiomere für Aufschluss hinsichtlich einer eudismischen Diskriminierung liefern. Erst die Röntgenstrukturanalyse eines Co-Kristalls mit DYRK1A sollte schließlich Aufschluss über den realen Bindungsmodus eines aktiven Inhibitors mit der Proteinkinase liefern.

2.6 Exkurs *homology modelling*

Im Rahmen der Training School des COST-Programmes Action CM1307 „*antiparasitic drug design and screening in silico*“ sollte Verbindung **21** in die Struktur der parasitären Proteinkinase *LinDYRK1* gedockt werden. Die *LinDYRK1* wurde ausgewählt, da sie bei Parasiten der Gattung *Leishmania* eine elementare Rolle bei der Ausbildung der Virulenz einnimmt. Die Arbeitsgruppe um SMIRLIS^[155] konnte zeigen, dass die *LinDYRK1* ein Analogon zur humanen DYRK1A darstellt. Außerdem wurde erwähnt, dass diese parasitäre Proteinkinase eine deutlich kleinere Bindetasche im Vergleich zur humanen DYRK1A aufweist. Dieser Aspekt klang vielversprechend, da die hier synthetisierten Verbindungen im Vergleich zu **19** deutlich kleinere Molekülmassen aufweisen. Um *docking*-Untersuchungen durchführen zu können, muss eine Proteinkristallstruktur vorliegen, die für *LinDYRK1* jedoch nicht verfügbar ist. Aus diesem Grund musste ein *homology modelling* erfolgen. Für die Durchführung eines *homology modelling* ist die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins nötig. Die Aminosäuresequenz wurde von SMIRLIS zur Verfügung gestellt. Zum Aufbau des Modells wurde das Programm Modeller 9.18 genutzt.^[156] Dazu wurde zunächst die Aminosäuresequenz in das FASTA-Format übertragen. Anschließend wurde die Aminosäuresequenz mittels BLAST^[108] mit Proteinen in der PDB verglichen. Bei dieser Suche wurden fünf verschiedene Co-Kristallstrukturen mit einer Übereinstimmung von 45% gefunden, die allesamt die humane DYRK1A vorschlugen. Um ein geeignetes Template zu finden, mussten diese Kristallstrukturen genauer untersucht werden. Für diesen Zweck wurde jede der fünf Kristallstrukturen als PDB-Datei heruntergeladen. Mit allen Dateien wurde ein

alignment der Kristallstruktur-Sequenz mit der FASTA-Sequenz von *Lin*DYRK1 durchgeführt. Anschließend wurde die Auflösung der Kristallstrukturen und die strukturelle Ähnlichkeit der Templates untereinander verglichen. Nach der Analyse wurde die Kristallstruktur mit der besten Auflösung ausgewählt. Anhand dieser Kristallstruktur wurde dann ein weiterer *alignment*-Schritt durchgeführt. Schließlich wurden fünf modellierte Kristallstrukturen erhalten. Anhand des DOPE-scores (*Discrete Optimized Protein Energy*) wurde die am besten modellierte Kristallstruktur ausgewählt.^[157] Die durch Modeller (Version 9.18) generierte Kristallstruktur konnte nun für *docking*-Untersuchungen verwendet werden.

Bei *docking*-Untersuchungen mit Verbindung **21** in das erzeugte Homologie-Modell wurde die in Abbildung 2-27A dargestellte Pose erhalten. Dabei wurde nur die Wasserstoffbrücke zwischen dem konservierten Lysin im hinteren Bereich der ATP-Bindetasche (*kLys*, analog zu Lys188 bei DYRK1A) mit dem Carbonylsauerstoffatom als polare Wechselwirkung beobachtet. Ein Wassermolekül, das eine Halogenbindung zum Leu der *hinge*-Region vermittelt, fehlte im Homologie-Modell. Eine grobe Ausmessung des Durchmessers der Bindetasche mit MOE ergab, dass die Bindetasche der *Lin*DYRK1 um ca. 2 Å schmäler ist. Sollte eine Isolierung und Kristallisation von *Lin*DYRK1 in Zukunft möglich sein, stellt diese parasitäre Proteinkinase ein weiteres interessantes Target für die hier beschriebenen Wirkstoffkandidaten dar.

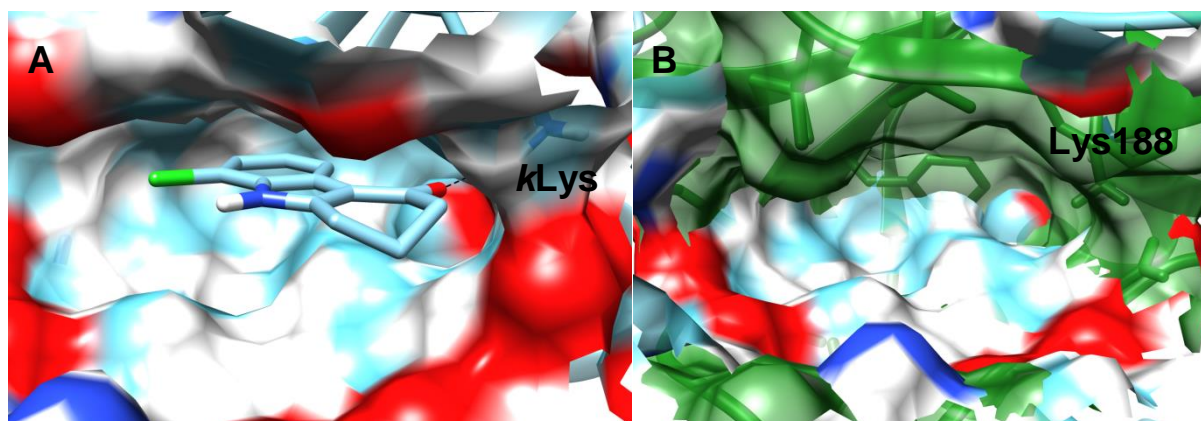


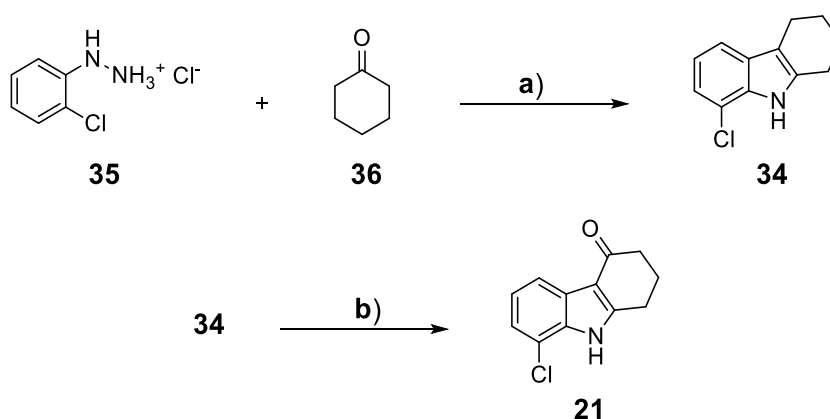
Abbildung 2-28: A) Bindungsmodus von **21** (cyan) in der ATP-Bindetasche des Homologie-Modells von *Lin*DYRK1. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt. B) Superimposition der ATP-Bindetaschenoberfläche von *Lin*DYRK1 (In dunkelblau, rot, gelb und cyan/weiß) mit der ATP-Bindetaschenoberfläche von DYRK1A (grün, PDB:4YLJ^[50]). In dunkelblau, rot und cyan/weiß wurden jeweils die Oberflächen von Sauerstoff, Stickstoff und Kohlenstoff dargestellt.

3 Synthese

Basierend auf aus den *docking*-Analysen gewonnenen Ergebnissen sollten Mannich-Basen aus 6-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**28**), 8-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**21**) und 1,2,3,9-Tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**33**) mit verschiedenen basischen Seitenketten synthetisiert werden. Da **21** und **28** nicht kommerziell verfügbar waren, mussten diese Ausgangsverbindungen zunächst synthetisiert werden. Verbindung **33** konnte erworben und direkt für anschließende Synthesen verwendet werden.

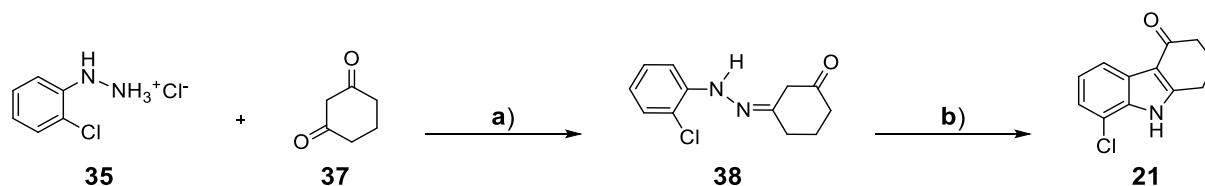
3.1 Synthese von 6/8-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on

Im ersten Schritt sollte die Synthese von Ausgangsverbindung **21** realisiert werden. Dazu wurden verschiedene Methoden angewendet. Zunächst sollte 8-Chlor-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-carbazol (**34**) in einer Fischer-Indol-Synthese aus 2-Chlorphenylhydrazin-hydrochlorid (**35**) und Cyclohexanon (**36**) in Eisessig unter Zugabe von Natriumacetat synthetisiert werden. Da diese Methode zu klebrigen schwarzen Teeren führte, in denen zwar das gewünschte Produkt detektiert wurde, aber die Aufarbeitung schlechte Ausbeuten lieferte, wurde eine weitere Methode von YEDUKONDALO *et al.* ^[158] angewendet, bei der wässrige Schwefelsäure eingesetzt wurde. Durch anschließende selektive Oxidation mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon (DDQ) nach einer Methode von YAMANE *et al.* ^[159] wurde Verbindung **21** erhalten (Schema 3-1).



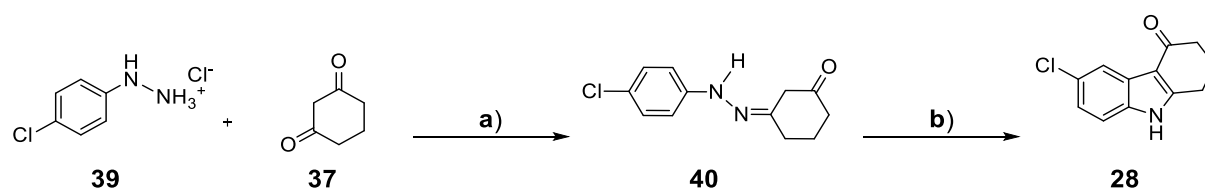
Schema 3-1: Zweistufige Darstellung von Verbindung **21**. a) aq. H₂SO₄ (10%), 90 °C, 1 h, Ausbeute 41% b) DDQ, 1,4-Dioxan/Wasser (10:1), 0 °C → RT, 1 h, Ausbeute: 36%.

Diese Methode zur Darstellung von Verbindung **21** führte ebenfalls zu einer geringen Rohausbeute. Da während der Fischer-Indol Synthese ölige Rückstände erhalten wurden und die Entfernung von überschüssigen DDQ problematisch war, wurden nach der Aufarbeitung nicht ausreichende Mengen für weitere Synthesen erhalten. Daher wurde eine Alternativsynthese nach FALKE zur Darstellung von **21** verwendet.^[145] Cyclohexan-1,3-dion (**37**) wurde mit **35** in Wasser zum Phenylhydrazon **38** umgesetzt, das im Anschluss durch Zusatz von wässriger Schwefelsäure zum Indol reagierte (Schema 3-2).



Schema 3-2: Darstellung von **21** nach FALKE^[145]. a) H₂O, 24 h, RT, Ausbeute 86–97% b) aq. H₂SO₄, 2 h, 100 °C, Ausbeute: 10–48%.

Die Ausbeuten zur Darstellung von **21** waren zufriedenstellender, sodass zur Synthese des 6-Chlor-Analogons **28** ebenfalls Cyclohexan-1,3-dion (**37**) als Ausgangsmaterial verwendet wurde. Als Reaktionspartner wurde 4-Chlorphenylhydrazin-hydrochlorid (**39**) verwendet. Statt wässriger Schwefelsäure wurde für die Synthese von **28** aus dem Phenylhydrazon **40** Trifluoressigsäure (TFA) verwendet, was bei LI und VINCE^[160] zu einer Gesamtausbeute von 69% führte, die hier aber nicht reproduziert werden konnte (Schema 3-3).

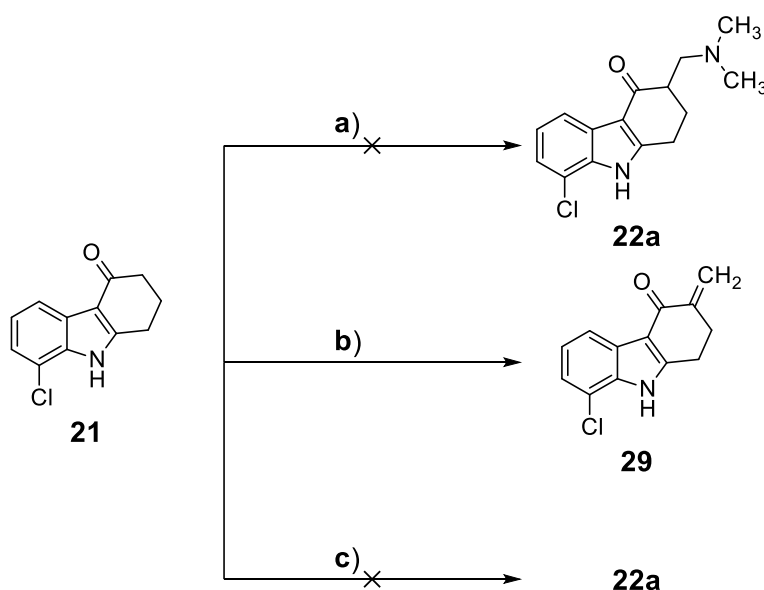


Schema 3-3: Darstellung von **28**. a) H₂O, 24 h, RT b) TFA, 14 h, 100 °C. Gesamtausbeute über zwei Stufen: 26%.

3.2 Synthese der Mannich-Basen aus 1,2,3,9-Tetrahydro-4*H*-carbazol-4-onen

3.2.1 Syntheseversuche

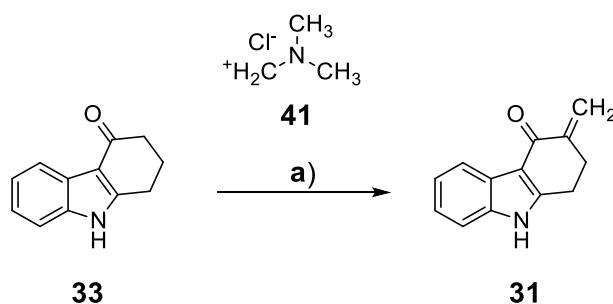
Ausgehend von **21** wurde zunächst in Anlehnung an LITTELL ^[161] eine Mannich-Reaktion mit Paraformaldehyd und Dimethylamin-Hydrochlorid unter Zusatz von wenigen Tropfen konz. HCl-Lösung probiert, was jedoch zu keiner Umsetzung führte. Auch die Verwendung von Essigsäure führte zu keinem Erfolg. Interessanterweise konnte während der Syntheseversuche ein Reaktionsprodukt isoliert werden, dessen analytische Daten zur Struktur von 8-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**29**) passten. Vermutlich zersetzt sich die entstandene Mannich-Base unter Refluxbedingungen zum entsprechenden 3-Methylen-carbazol-4-on. Bei einer Reaktion mit Essigsäure bei Raumtemperatur zeigte sich keine Umsetzung zur Mannich-Base, jedoch konnte dünnschichtchromatographisch und massenspektrometrisch erneut eine geringe Umsetzung zum 3-Methylen-carbazol-4-on festgestellt werden. Alle durchgeführten Syntheseversuche sind in Schema 3-4 zusammengefasst.



Schema 3-4: Versuche zur Darstellung von **22a**. **a)** Paraformaldehyd, Dimethylamin-Hydrochlorid, Ethanol, 2 h, 100 °C, keine Umsetzung **b)** Paraformaldehyd, Dimethylamin-Hydrochlorid, Eisessig, 13 h, 120 °C, Isolierung von **29**, Ausbeute 13% **c)** Paraformaldehyd, Dimethylamin-Hydrochlorid, Eisessig, 2 h, RT, dünnschichtchromatographische und massenspektrometrische Detektion von **29**.

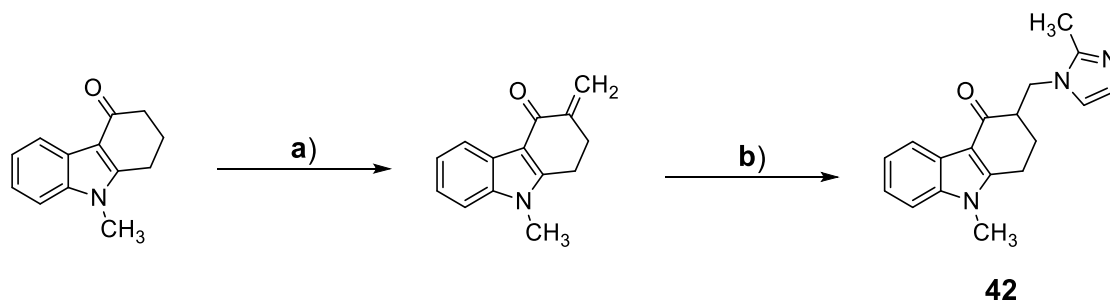
Da die Darstellung der entsprechenden Mannich-Basen aus Verbindung **21** in einer Drei-Komponenten-Reaktion nicht erfolgreich war, wurden alternative Synthesewege gesucht. Verbindung **33** konnte kommerziell erworben werden, sodass Untersuchungen zur Synthese entsprechender Mannich-Basen mit **33** als Ausgangsstoff durchgeführt wurden. In einer Vorschrift von HORSTMANN und UNTERHALT ^[162] zur Herstellung der nicht substituierten Dimethylamin-Mannich-Base **27a** wurde das Böhme-Salz *N,N*-Dimethylmethyleniminiumchlorid (**41**) statt Paraformaldehyd und Dimethylamin-Hydrochlorid verwendet. Bei der Verwendung dieser Synthesevorschrift wurde zunächst Acetonitril als Lösungsmittel in Kombination mit Acetylchlorid eingesetzt. Es konnte erstmalig eine Umsetzung zur Mannich-Base nachgewiesen werden. Allerdings wurden auch viele Nebenprodukte detektiert, sodass nach Aufarbeitung nur eine kleine Menge eines stark verunreinigten Feststoffes, der unter anderem **27a** enthielt, erhalten wurde. Ein Wechsel des Lösungsmittels zu THF führte zu keiner Verbesserung.

Aufgrund einer großen Ähnlichkeit zwischen **27a** und dem zugelassenen Antiemetikum Ondansetron (**42**) wurden Darstellungsvorschriften für diesen Arzneistoff systematisch gesichtet. Bei einer dieser Methoden wurde DMF als Lösungsmittel verwendet.^[163] Bei der Übertragung auf die geplante Synthese von **27a** wurde statt Paraformaldehyd/Dimethylamin-Hydrochlorid wiederum das Böhme-Salz eingesetzt. Als Reaktionsprodukt wurde jedoch nicht **27a**, sondern das 3-Methylen carbazol-4-on **31** in hoher Ausbeute gewonnen (Schema 3-5).



Schema 3-5: Darstellung des 3-Methylen carbazol-4-ons **31** aus **33**. a) DMF, Eisessig, Acetylchlorid, 4 h, 100 °C, Ausbeute: 59–86%.

Ein zu **42** entsprechendes 3-Methylencarbazol-4-on resultierte auch während der Synthese von **42** (Schema 3-6). Die Bildung des 3-Methylencarbazol-4-ons wurde dabei durch den Zusatz eines Ammoniumsalzes gefördert.^[163] KIM *et. al* formulierten einen zweistufigen Reaktionsmechanismus, in dem das 3-Methylencarbazol-4-on als Zwischenprodukt beschrieben wurde (Schema 3-6).^[164]



Schema 3-6: Darstellung von **42** nach KIM *et al.* ^[164] **a)** Eisessig, Formaldehyd, Morpholin, Reflux, 5 h, Ausbeute: 70%. **b)** Toluol, Al₂O₃, 2-Methylimidazol, Reflux, 4 h, Ausbeute: 70%.

Deshalb wurde im nächsten Schritt eine gezielte Synthese von Intermediat **31** angestrebt, das im Anschluss durch eine nucleophile Addition zur Verbindung **27a** umgesetzt werden sollte. Zunächst sollte die Synthese von Intermediat **31** untersucht und die Reaktionsbedingungen angepasst werden. Daher wurde eine Synthese ohne die als kritisch eingestuften Reagenzien Eisessig und Acetylchlorid durchgeführt.^[163] Der Reaktionsverlauf wurde mittels Gradient-HPLC überwacht. Nach etwa 2 h konnte eine vollständige Umsetzung von **33** zu **31** festgestellt werden (Abbildung 3-1). Nach Abbruch der Reaktion wurde dem Reaktionsansatz Wasser zugesetzt und der ausgefallene Feststoff ohne weitere Aufarbeitung in reiner Form erhalten.

Im nächsten Schritt wurden diese Synthesebedingungen für die chloresubstituierten Edukte **21** und **28** angewendet. Für Verbindung **29** wurde wieder eine Kontrolle des Reaktionsverlaufes mittels Gradient-HPLC durchgeführt. Diese ergab eine vollständige Umsetzung nach 4 h (Abbildung 3-2). Für alle durchgeführten Synthesen wurde ein dreifacher Überschuss des Böhme-Salzes verwendet. Reaktionsbedingungen für **29**, **30** und **31** und Ausbeuten sind in Schema 3-7 zusammengefasst.

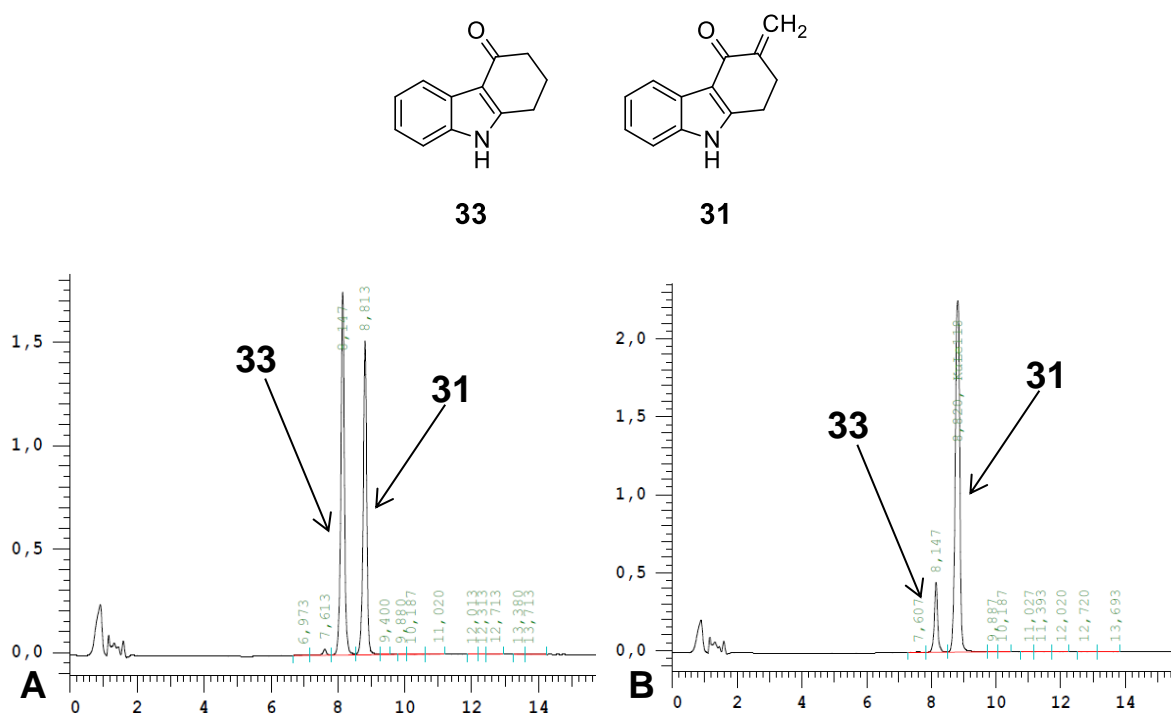


Abbildung 3-1: Reaktionskontrolle zur Synthese der Verbindung **31**. **A)** Reaktionskontrolle nach 30 min Reaktionszeit, Auswertung mit der 100%-Methode, HPLC-Umsatz 46%. **B)** Reaktionskontrolle nach 90 min Reaktionszeit, Auswertung mit der 100%-Methode, HPLC-Umsatz 87%. Auf der X-Achse wurde die Retentionszeit und auf der Y-Achse AU (Absorption) angegeben. Nicht dargestellt Vollständige Umsetzung nach 2 h (HPLC-Umsatz 97%).

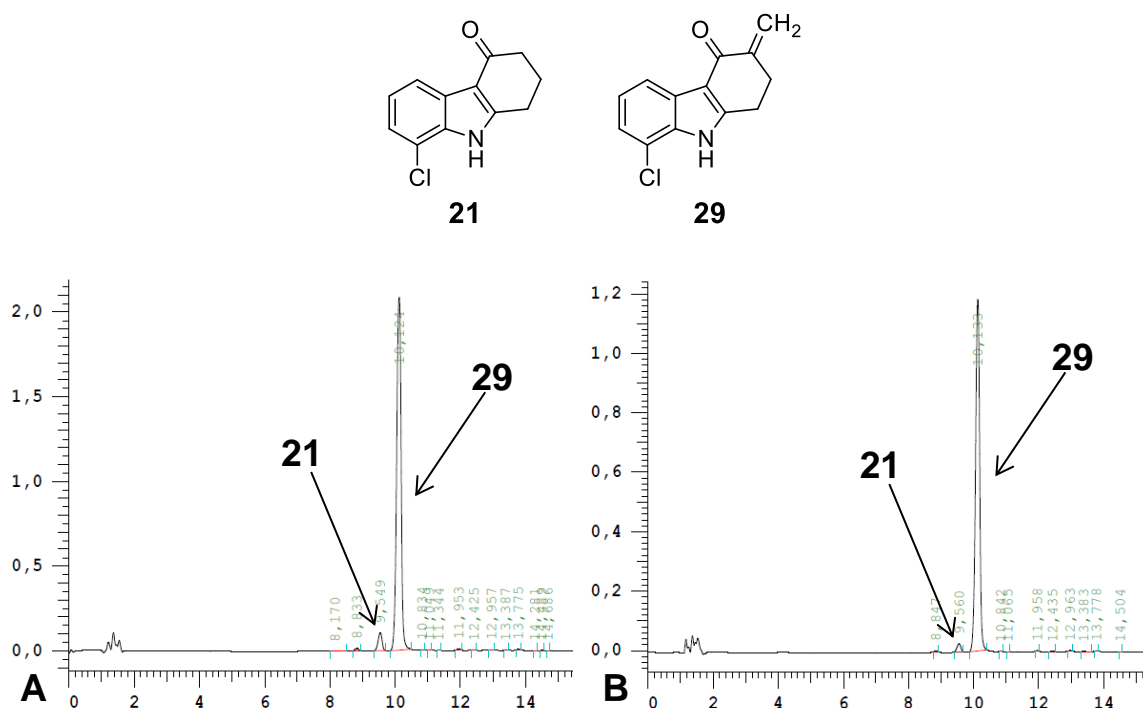
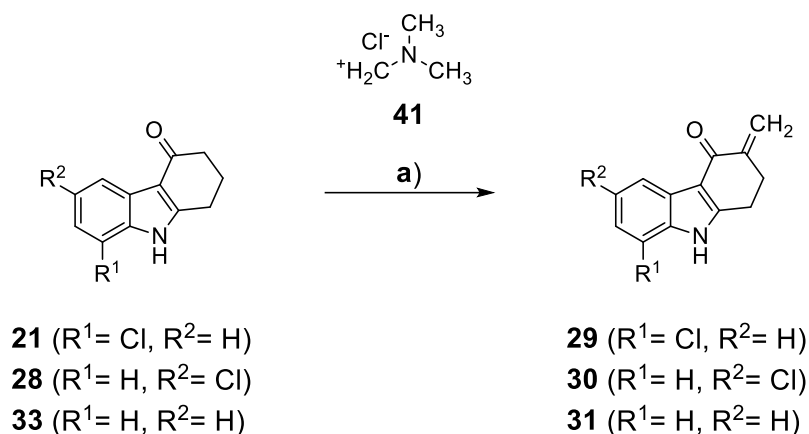
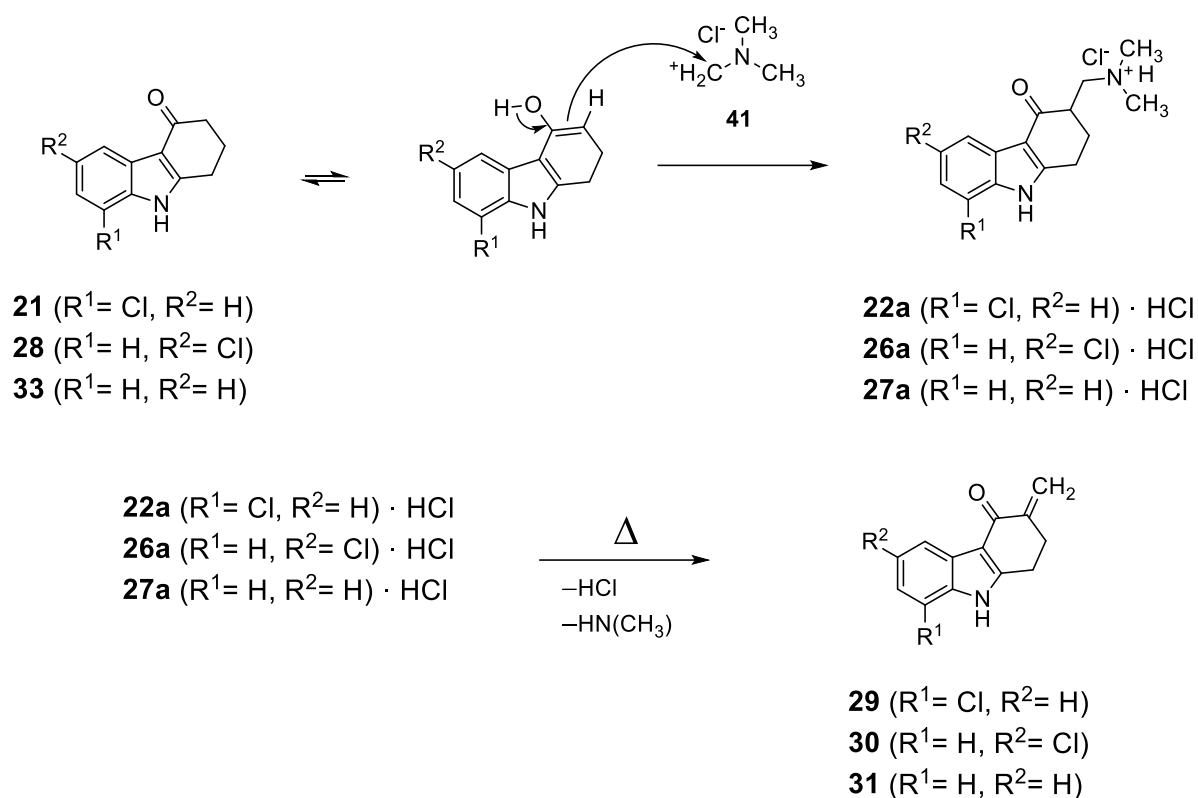


Abbildung 3-2: Reaktionskontrolle zur Synthese der Verbindung **29**. **A)** Reaktionskontrolle nach 150 min Reaktionszeit, Auswertung mit der 100%-Methode, HPLC-Reinheit 95%. **B)** Reaktionskontrolle nach 240 min Reaktionszeit, Auswertung mit der 100%-Methode, HPLC-Reinheit 97%. Auf der X-Achse wurde die Retentionszeit und auf der Y-Achse AU (Absorption) angegeben.



Schema 3-7: Darstellung der Verbindungen **29**, **30** und **31**. a) 1. DMF, 3 Äquivalente **41**, 2 h, 130 °C; 2. H₂O. Ausbeuten: **29** (56–86%), **30** (75%) und **31** (63–74%).

Die Syntheseveruche zur gezielten Synthese der 3-Methylen-carbazol-4-one ergaben reproduzierbare Ergebnisse und Ausbeuten. Die Reaktionsprodukte konnten durch Fällung mit Wasser in zufriedenstellender Ausbeute ohne weitere Aufarbeitung isoliert werden. Als Reaktionsmechanismus wird ein Addition-Eliminierungs-Mechanismus postuliert (Schema 3-8). Im ersten Schritt findet eine Tautomerisierung des Ketons zum entsprechenden Enol statt. Aus der Enolform findet ein nucleophiler Angriff am Carbenium-Ion von **41** statt. Es entstehen zunächst die Mannich-Basen **22a**, **26a** und **27a** als Hydrochloride, die durch Hitzeeinwirkung Dimethylamin und Chlorwasserstoff eliminieren. Es resultieren die 3-Methylen-carbazol-4-one **29**, **30** und **31**. Massenspektroskopische Reaktionskontrolle zeigte während Inprozesskontrollen stets auch einen Peak für die Molmasse der entsprechenden Mannich-Basen. Dieser Prozess kann als α -Methylenierung analog zu VALE *et al.* ^[165] klassifiziert werden.

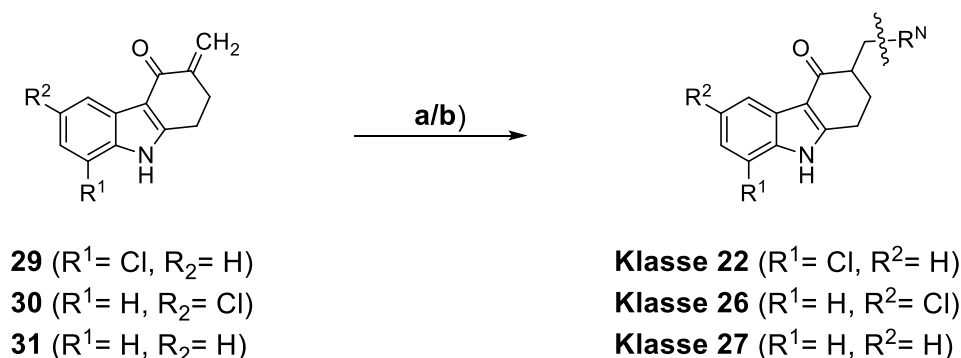


Schema 3-8: Postulierter Additions-Eliminierungs-Reaktionsmechanismus zur Darstellung der 3-Methylencarbazol-4-one **29**, **30** und **31**.

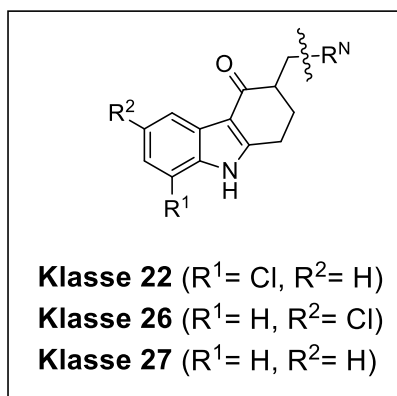
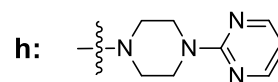
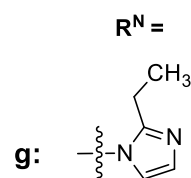
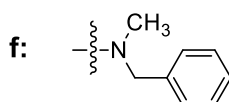
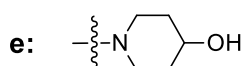
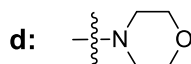
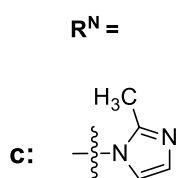
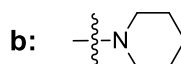
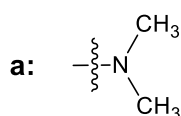
3.2.2 Synthese der Mannich-Basen aus 3-Methylencarbazol-4-onen

Ausgehend von den 3-Methylencarbazol-4-onen **29**, **30** und **31** wurde nach Synthesestrategien gesucht, die eine nucleophile Addition von sekundären Aminen an α , β -ungesättigte Ketone ermöglicht. JENNING berichtete von einer ähnlichen Reaktion zur Darstellung von Ondansetron-Analoga.^[166] Dabei wurde meist ein dreifacher Überschuss des Nukleophils (Amin-Komponente) verwendet, welches zusammen mit dem 3-Methylencarbazol-4-on in einer 1:1 Mischung aus 1,4-Dioxan und Wasser zur Reaktion gebracht wurde. Anschließend wurde ein Extraktionsschritt durchgeführt und durch Umkristallisation oder Säulenchromatographie die entsprechende Endstufe erhalten.^[166] Die Temperatur bei der Durchführung richtete sich vor allem nach dem Siedepunkt des Nukleophils. Im Regelfall liefen die Reaktionen bei Temperaturen zwischen 50 und 100 °C ab. Die Reaktionszeit sank mit Zunahme der Temperatur erwartungsgemäß. Für niedrigsiedende Amin-Komponenten ergab sich somit eine lange Reaktionszeit bei niedriger Temperatur.

Mit diesen Reaktionsbedingungen gelang es erstmals, Verbindung **27a** zu synthetisieren. Daher wurden diese Reaktionsparameter auch zur Darstellung aller Analogverbindungen verwendet. Im späteren Verlauf der Experimente wurde eine weitere Methode verwendet, bei der lediglich Wasser als Reaktionsmedium eingesetzt wurde. Die Ausbeuten dieses zweiten Weges waren im Vergleich deutlich geringer, da längere Reaktionszeiten und höhere Temperaturen benötigt wurden.^[167] Im Anschluss an die nucleophile Addition schloss sich meist eine Extraktion oder eine Umkristallisation an. Einige Mannich-Basen zeigten im Verlauf der analytischen Verfahren eine zeitabhängige Zersetzung (festgestellt durch HPLC-Reinheitsbestimmungen), sodass es für einige Derivate notwendig war, eine Fällung als Hydrochlorid vorzunehmen (Schema 3-9). Das entsprechende Substitutionsmuster der synthetisierten Endstufen kann aus Schema 3-10 entnommen werden. Eine ggf. erforderliche Umwandlung in das Hydrochlorid wird im späteren Verlauf entsprechend gekennzeichnet.



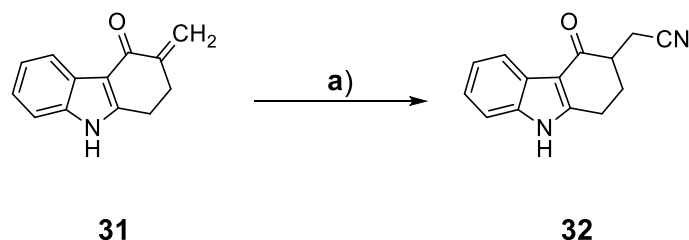
Schema 3-9: Darstellung der Mannich-Basen der Klassen **22**, **26** und **27**. **a)** 1,4-Dioxan/ H_2O (1:1), Aminkomponente, 16–18 h, 55–100 °C, Ausbeuten 10–62% **b)** H_2O , Aminkomponente, 120 °C, 20–48 h, Ausbeuten 5–25%; Reaktionsbedingungen bei **22e**, **22g** und **27g**. R^N kann Schema 3-10 entnommen werden.

 $R^N =$ 

Schema 3-10: Strukturen der Mannich-Basen aus den Klasse **22**, **26** und **27**. Beispiele mit den Aminkomponenten **g** und **h** wurden nicht für alle Klassen synthetisiert.

3.2.3 Synthese von 2-(4-Oxo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-3-yl)acetonitril

Die Synthese von **32** wurde durch nucleophile Addition von Cyanid an Verbindung **31** realisiert. Ähnlich wie bei der Synthese der Mannich-Basen wurde eine Mischung aus 1,4-Dioxan und Wasser als Reaktionsmedium verwendet (Schema 3-11). Verbindung **32** wurde als Vorstufe zur Darstellung potentieller Derivate synthetisiert, die durch anschließende chemische Umsetzung der Nitril-Gruppe geplant waren.



Schema 3-11: Synthese von Verbindung **32**. a) 1,4-Dioxan/ H_2O (1:1), KCN, 55 °C, 24 h, Ausbeute: 71%.

3.3 Analytische Besonderheiten der Mannich-Base 27a

In diesem Abschnitt sollen beispielhaft analytische Besonderheiten der Verbindung **27a** gezeigt werden, die im Rahmen massenspektrometrischer und Kernresonanzspektroskopischer Untersuchungen beobachtet wurden.

3.3.1 Massenspektrometrische Untersuchungen

Bei den massenspektrometrischen Experimenten wurde zunächst eine APCI-Methode (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) verwendet. Die Methode kann Kationen und Anionen, die durch hohe Energie und Stickstoffgas erzeugt werden, im positiven oder negativen Modus nachweisen. In diesem Kapitel ist beispielhaft das Spektrum des positiven Modus gezeigt. Die Methode führte zu einer Fragmentierung der Mannich-Base **27a**. Als charakteristischer Basispeak konnte die Massenzahl des 3-Methylencarbazol-4-ons **31** detektiert werden (Schema 3-12). Neben einen Peak bei Massenzahl 170, der vermutlich durch Abspaltung von CO resultiert, wurde auch ein Peak mit einer Massenzahl 58, was der Masse des Böhme-Salz-Kations entspricht, gefunden (Abbildung 3-3). Die möglichen Fragmente sind in Schema 3-12 dargestellt.

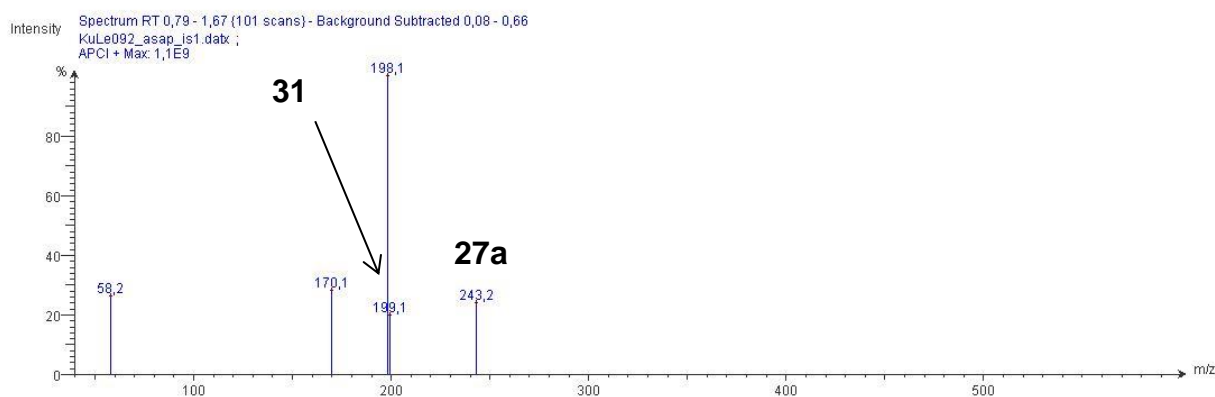
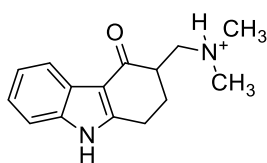
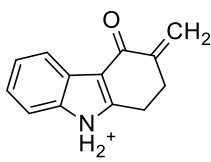


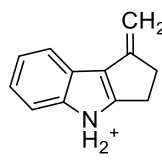
Abbildung 3-3: APCI-Vermessung der Verbindung **27a** im positiven Modus. Auf der X-Achse wurde das Masse-Ladungs-Verhältnis dargestellt und auf der Y-Achse die Signalintensität in %. Probenauftragung mit der ASAP-Sonde (*Atmospheric Solids Analysis Probe*).

**27a**

Massenzahl: 243

**31**

Massenzahl: 198

**41**

Massenzahl: 58

Schema 3-12: Schematische Darstellung möglicher Fragmente, die während der APCI-Messung im positiven Modus entstanden sein können. Die exakte Masse (Massenzahl) wurde mit ChemDraw bestimmt.

In einigen APCI-Analysen war kein Peak für die Molekülmassen der Mannich-Basen zu detektieren. Oft verschwand dieser im zeitlichen Verlauf der Messung gänzlich, sodass eine ESI-Methode (*Electron Spray Ionization*), die besonders zur Detektion von basischen Verbindungen geeignet ist, angewendet wurde.^[168] Im Vorfeld wurde die Probe in wenig THF gelöst und mit wenigen Tropfen Essigsäure versetzt. Da lediglich Signale im positiven Modus mit der ESI-Methode detektiert wurden, wird dieses Spektrum dargestellt (Abbildung 3-4). Während kein Peak für die Massenzahl des Eduktes gefunden wurde, wurden verschiedene Addukt-Peaks detektiert. Natrium-Addukte sind in der ESI-Analytik häufig zu finden.^[169] Daher ist es nicht verwunderlich, dass ein Peak mit der Massenzahl $[M+Na]^+$ gefunden wurde (m/z : 265). Des Weiteren wurde ein Addukt mit Na^+ und dem Lösungsmittel THF detektiert (m/z : 337). Der Peak mit m/z : 297 konnte dem Addukt $[M+Na^+MeOH]^+$ zugeordnet werden, da Methanol zur Erzeugung des Sprays eingesetzt wurde. (Abbildung 3-4).

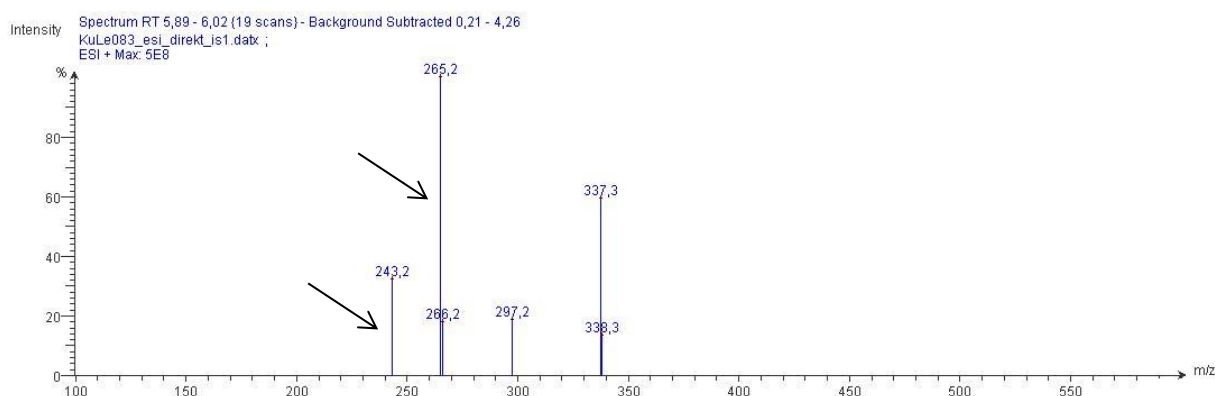


Abbildung 3-4: ESI-Vermessung der Verbindung **27a** im positiven Modus. Auf der X-Achse wurde das Masse-Ladungs-Verhältnis dargestellt und auf der Y-Achse die Signalintensität in %. Probenauftragung durch Direkteinspritzung. Im ESI(-)-Modus wurden keine Signale detektiert.

Durch die Verwendung der ESI-Methode konnte nachgewiesen werden, dass erst entsprechende Fragmentierungsprozesse bei APCI-Vermessung zur Bildung von **31** führten. Diese Fragmentierung wurde während der durchgeführten ESI-Vermessung jedoch nicht festgestellt. Daher wurden im weiteren Verlauf ESI-Methoden in massenspektrometrischen Untersuchungen eingesetzt.

3.3.2 NMR-Spektroskopische Untersuchungen

Das Stereozentrum in Position 3 der Mannich-Basen führte zu komplexen Signalaufspaltungen in den NMR-Spektren. Diese Komplexität wurde durch CH_2 -Gruppen hervorgerufen, da die einzelnen H-Atome dieser Gruppen durch Einführung eines Stereozentrums magnetisch inäquivalent wurden. Das ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **27a** · HCl ist in Abbildung 3-5 dargestellt.

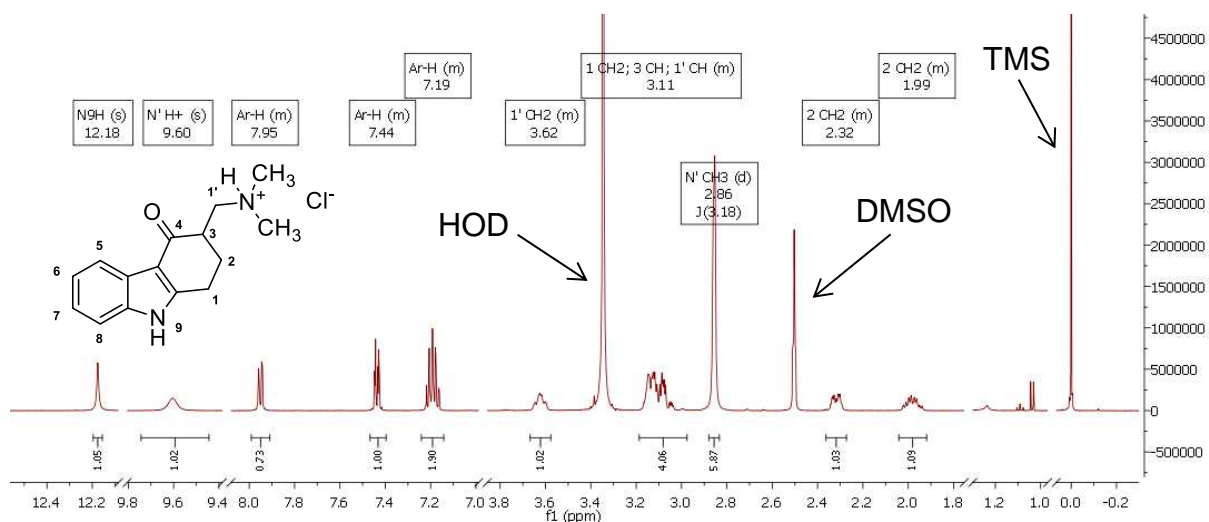


Abbildung 3-5: ^1H -NMR-Spektrum des Hydrochlorids von Verbindung **27a**. Zur besseren Darstellung wurden signalfreie Bereiche aus dem Spektrum entfernt.

Um die teilweise magnetisch inäquivalenten H-Atome der CH_2 -Gruppen zweifelsfrei zuordnen zu können, wurde ein HSQC-Spektrum (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) von Verbindung **27a** aufgenommen. Dieses 2D-NMR-Experiment zeigt die Kopplungen zwischen Kohlenstoff und direkt daran gebundenen H-Atomen. Das Experiment ermöglicht somit eine Verknüpfung von ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektrum. Das eindimensionale ^{13}C -NMR-Spektrum ist in Abbildung 3-6 dargestellt, das entsprechende HSQC-Experiment wird in Abbildung 3-7 wiedergegeben.

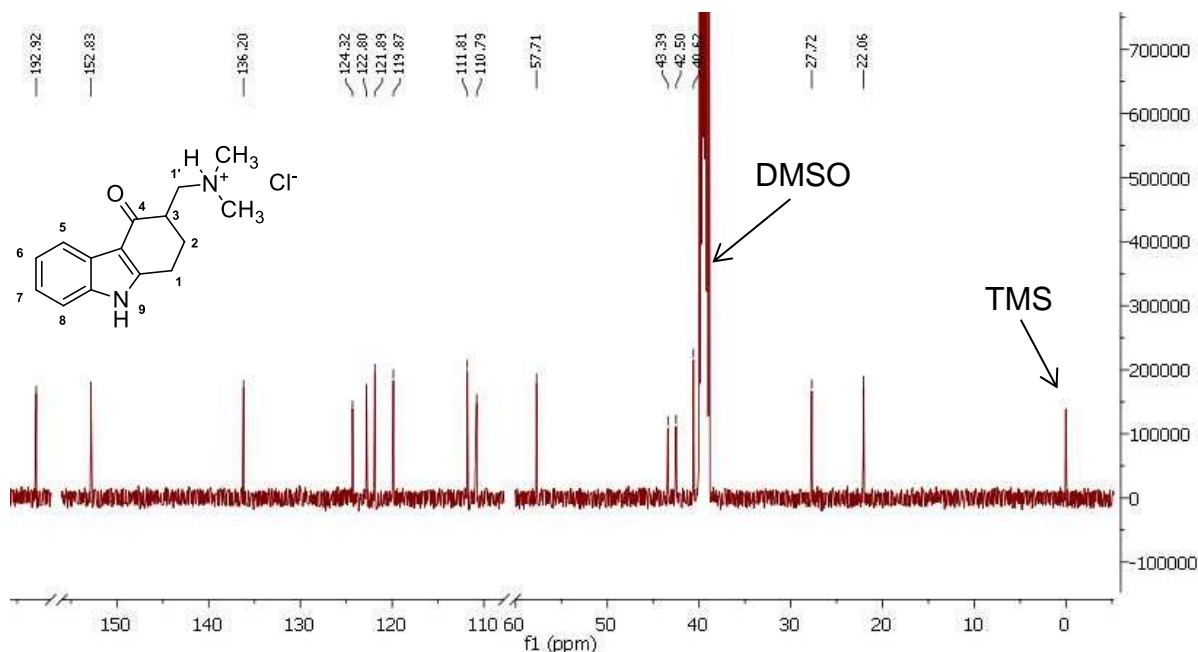


Abbildung 3-6: ^{13}C -NMR-Spektrum des Hydrochlorids von Verbindung **27a**. Zur Erhöhung der Übersichtlichkeit wurden signalfreie Bereiche aus dem Spektrum entfernt.

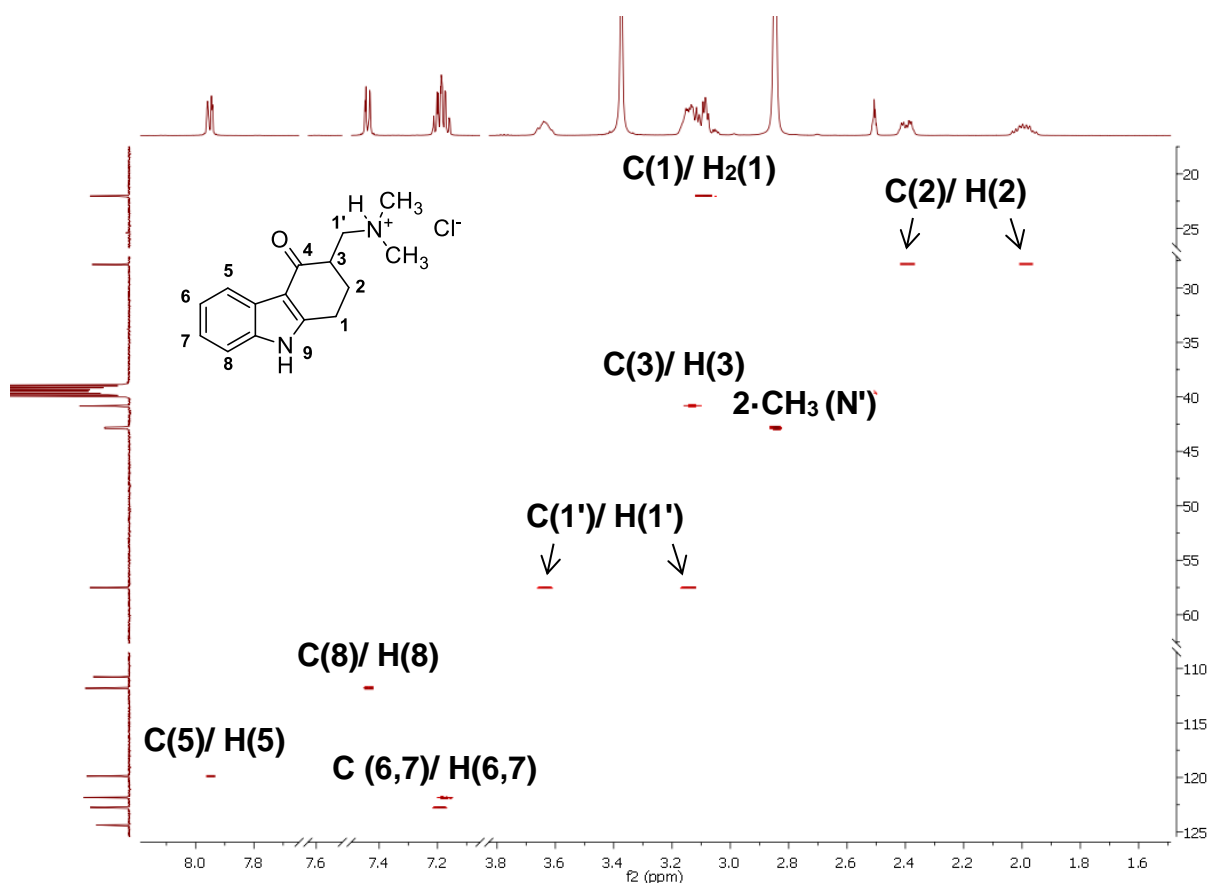


Abbildung 3-7: 2D-HSQC-Experiment des Hydrochlorids von Verbindung **27a**. Verknüpfung zwischen ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum. Die zusammengehörenden C- und H-Atome werden durch die Kreuzpunkte ermittelt. Eine mögliche Zuordnung ist angegeben. Zur Erhöhung der Übersichtlichkeit wurden signalfreie Bereiche aus dem Spektrum entfernt.

Eine weitere Besonderheit der NMR-Experimente betraf die beiden Methylgruppen am N'-Stickstoff, für die chemische und magnetische Äquivalenz erwartet wurde. Bei der Analyse der ^1H -NMR-Spektren fiel jedoch auf, dass das Signal bei 2.86 ppm im ^1H -NMR-Spektrum kein eindeutiges Singulett darstellte, sondern eine Schulter aufwies (Abbildung 3-8).

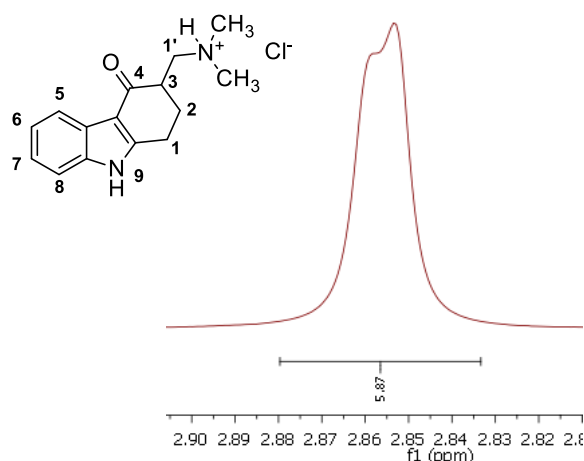


Abbildung 3-8: Detaillierte Darstellung des ^1H -NMR-Signals für die Methylgruppen am N'-Stickstoff von **27a** · HCl. Darstellung des vermuteten Singulett, das eine Schulter aufwies.

Genauere Analyse des ^{13}C -NMR-Spektrums zeigte für beide Methylgruppen ebenfalls eine Signalaufspaltung. Da sich diese Aufspaltungen in den NMR-Spektren der freien Base von **27a** nicht zeigten, wurde die Fällung als Hydrochlorid als mögliche Erklärung in Betracht gezogen. Der Grund für die chemische und magnetische Inäquivalenz der Methylgruppen lag vermutlich in der Ausbildung einer intramolekularen H-Brücke (IWB) zwischen dem N'-Wasserstoffatom und dem Carbonylsauerstoffatom, die sich bei der freien Base nicht ausbilden konnte. Durch die sterische Fixierung aufgrund der IWB und der Anwesenheit eines Stereozentrums in Position 3 wurden die Methylgruppen diastereotop und damit anisochron. Um diesen Effekt zu veranschaulichen, wurden die ^{13}C -NMR-Spektren des Hydrochlorids und der freien Base in Abbildung 3-9 einer Superimposition unterzogen.

Tiefeld

Hochfeld

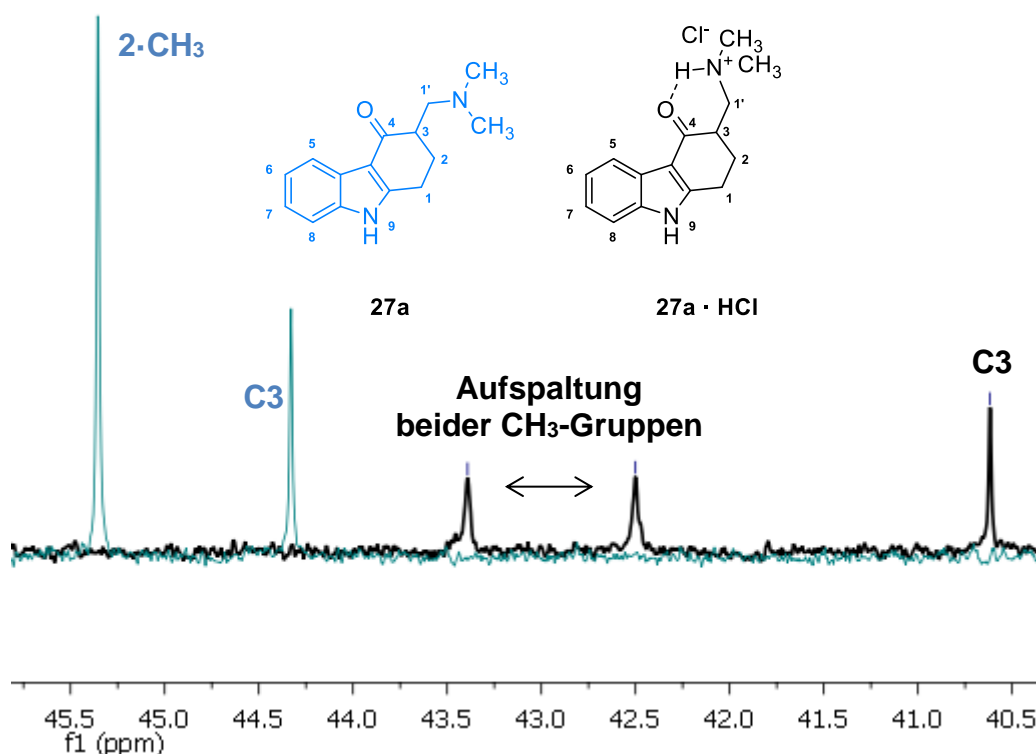


Abbildung 3-9: Superimposition der ^{13}C -NMR-Spektren von **27a** als freie Base (blau) und als Hydrochlorid (schwarz).

ANDO *et al.* zeigten, dass H-Brücken vom Typ $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}^+$ sich im Gegensatz zu H-Brücken vom Typ $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ durch eine Hochfeldverschiebung im ^{13}C -NMR-Spektrum auszeichnen.^[170] Diese Hochfeldverschiebung kann in Abbildung 3-9 eindeutig beobachtet werden. Von dieser Verschiebung betroffen waren vor allem C-Atome, die sich in der Nähe zum N^+ -Stickstoff befinden (vgl. C3, Abbildung 3-9). Eine Aufspaltung der CH_3 -Signale im ^1H -NMR-Spektrum wurde für die freie Base hingegen nicht festgestellt. Diese Aspekte zusammen deuten daher auf die Ausbildung einer intramolekularen H-Brücke hin. Bei den Dimethylamin-Hydrochloriden **22a** und **26a** wurden analoge Beobachtungen gemacht, was die oben ausgeführte Vermutung bestätigt.

4 Biologische Aktivität

Die synthetisierten Endstufen der Klassen **22**, **26**, und **27** sowie die 3-Methylen-Verbindungen **29** – **31** wurden hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivitäten gegenüber DYRK1A und verwandten Kinasen getestet. Dies geschah mit einem Lumineszenz-Enzymassay, der von Manros Therapeutics (Roscoff, Frankreich) unter der Leitung von Prof. Laurent Meijer durchgeführt wurde.

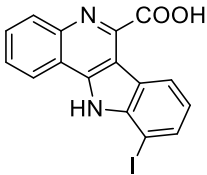
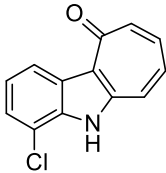
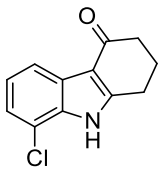
4.1 Allgemeines Vorgehen zur Bestimmung der Hemmaktivitäten

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden in einem GloTM Enzymassay hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität evaluiert. Die Quantifizierung der Hemmaktivität wurde durch Messung der durch die Kinaseaktivität gebildeten Menge ADP realisiert. Im ersten Schritt wurde die entsprechende Proteinkinase zusammen mit einem spezifischen Substrat, Puffer und ATP (10 µM) für 30 min bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Kinase-Reaktion durch Zugabe des ADP-GloTM-Reagenzes gestoppt. Zusätzlich wurde überschüssiges ATP entfernt, sodass nur noch durch die untersuchte Proteinkinase gebildetes ADP in der Lösung vorlag. Dieses ADP wurde im danach mit dem Kinase-Detektions-Reagenz in ATP umgewandelt. Nach weiterer Inkubation bei Raumtemperatur wurde eine Luciferase-Reaktion induziert, bei der durch eine Enzymreaktion eine Lumineszenz detektiert werden kann. Der Enzymassay wurde bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt und der IC₅₀-Wert bei ausgewählten Verbindungen in einer Zweifachmessung bestimmt.

4.2 Kinaseinhibitorische Aktivität [b]-anellierter Indole als Leitstrukturen

Als Referenz für die biologische Aktivität wurden die von FALKE ^{[50],[145]} beschriebenen Verbindungen **19–21** verwendet, da sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Leitstrukturen dienten (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Inhibitorische Aktivitäten (IC₅₀-Werte) von **19–21** an DYRK1A/1B und CLK1/4.^a

	DYRK1A	DYRK1B	CLK1	CLK4
 <p>19</p>	0.0063	0.60	0.50	0.21
 <p>20</p>	0.20	n. b.	0.17	n. b.
 <p>21</p>	1.6	n. b.	0.30	n. b.

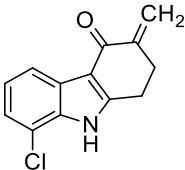
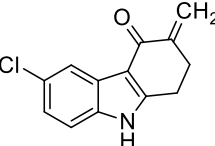
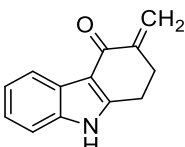
^a IC₅₀-Werte [μM] an ausgewählten Proteinkinasen der Inhibitoren, die von FALKE ^[145] im Rahmen seiner Dissertation synthetisiert wurden. n. b.: nicht bestimmt

Bei den Inhibitoren **19–21** zeigte sich eine Abnahme der Hemmaktivität mit abnehmender Planarität der Verbindung. Von den Verbindungen **19** und **21** synthetisierte FALKE ebenfalls unsubstituierte Derivate, die jeweils eine deutlich geringere Aktivität als die Halogen-substituierten Derivate aufwiesen.^[145] Offensichtlich ist der Halogen-Substituent für die Inhibition der untersuchten Proteinkinasen mitverantwortlich. FALKE zeigte ebenfalls auf, dass ein H-Brücken-Akzeptor-Motiv zwingend notwendig für eine hohe Hemmaktivität war. Während Verbindungen **20** und **21** ein schlechtes Selektivitätsprofil für DYRK1A und DYRK1B aufwiesen, konnte für Verbindung **19** gegenüber den nahverwandten Proteinkinasen eine hohe Selektivität nachgewiesen werden.^[145] Durch Einführung einer basischen Seitenkette bei Verbindung **21** sollte sowohl die inhibitorische Aktivität als auch die Selektivität gesteigert werden.

4.3 Kinaseinhibitorische Aktivität der 3-Methylencarbazon-4-one

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der 3-Methylencarbazon-4-one zur Verbindung **21** wurden diese Vorstufen (**29**, **30** und **31**) ebenfalls an den Proteinkinase DYRK1A und CLK1 getestet (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Inhibitorische Aktivität der Verbindungen **29**, **30** und **31**.^a

	DYRK1A	CLK4
 <p>29</p>	1.736	0.3158
 <p>30</p>	>10	>10
 <p>31</p>	>10	>10

^a IC₅₀-Werte [μM], der synthetisierten 3-Methylencarbazon-4-one, an ausgewählten Proteinkinasen.

Von den untersuchten 3-Methylen-Verbindungen zeigte nur Verbindung **29** Aktivität an DYRK1A (IC₅₀-Wert: 1.736 μM) und CLK4 (IC₅₀-Wert: 0.3158 μM). Die 6-Chlorverbindung **30** und die unsubstituierte Variante **31** zeigten an keiner der getesteten Proteinkinasen Aktivität. Die hohe Ähnlichkeit der Struktur und der generierten *docking*-Posen sowie die vergleichbare Aktivität an DYRK1A im Vergleich von **21** und **29** zeigten auf, dass die Substitution mit Chlor in 8-Position für die Hemmaktivität an den untersuchten Kinasen essentiell ist. Die hier erzielten Ergebnisse stimmen mit den vorhergesagten *docking*-Posen für Verbindung **29** überein. Der Chlor-Substituent von Verbindung **29** geht vermutlich eine wasservermittelte Halogenbindung zur *hinge*-Region ein (Abbildung 4-1).

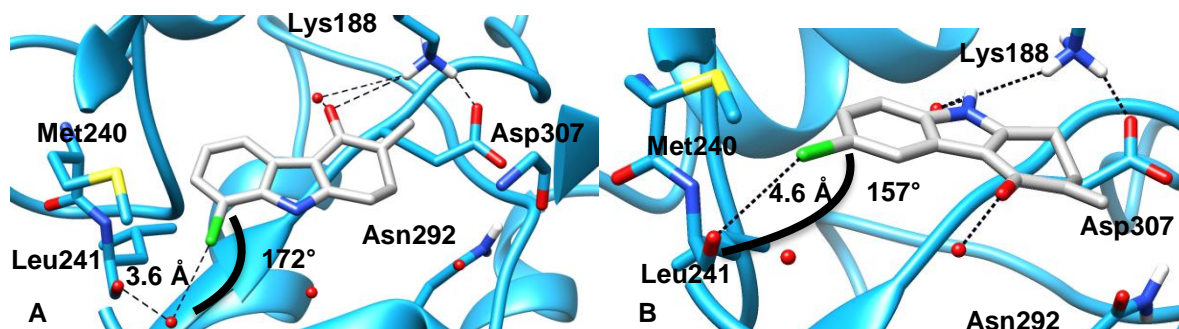


Abbildung 4-1: Ergebnisse aus *docking*-Experimenten mit A) **29** (grau) und B) **30** in der ATP-Bindetasche von DYRK1A (cyan, PDB:4YLJ^[50]). Der σ -hole-Winkel einer hypothetischen Halogenbindung wurde durch eine gebogene schwarze Linie dargestellt. Mögliche Interaktionen wurden durch unterbrochene schwarze Linien dargestellt.

Die durch *docking*-Experimente vorhergesagte Orientierung von **30** in der ATP-Bindetasche (Abbildung 4-1, B) im Vergleich zu **29** kann zur Erklärung der unterschiedlichen Hemmaktivitäten beider Verbindungen herangezogen werden, denn bei **30** erscheinen die geometrischen Eigenschaften einer potentiellen wasservermittelten Halogenbindung unvorteilhafter und Schlüsselinteraktion zwischen der Carbonylfunktion und Lys188 fehlt. Auch die Lage innerhalb der ATP-Bindetasche erschien bei den vorhergesagten Posen von Verbindung **29** günstiger (vgl. Abbildung 2-23 und 2-24).

4.4 Kinaseinhibitorische Aktivität von Carbazol-4-on-Mannich-Basen

Die Einführung von basischen Seitenketten an Carbazol-4-one in 3-Position lieferte bei *docking*-Experimenten vielversprechende Posen. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mannich-Basen wurden daher im bereits dargestellten Enzym-Assay u. a. an DYRK1A, DYRK1B, CLK1 und CLK4 getestet. Die Ergebnisse der biologischen Evaluation sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

Tabelle 4-3: Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der synthetisierten Mannich-Basen der Klassen **22**, **26** und **27** und Verbindung **32** an ausgewählten Proteinkinasen.^a

	DYRK1A	DYRK1B	CLK1	CLK4
22a · HCl	> 10	n. b.	n. b.	> 10
26a · HCl	94%	98%	87%	90%
27a · HCl	> 10	n. b.	n. b.	> 10
22b · HCl	> 10	n. b.	n. b.	> 10
26b	90%	88%	87%	89%
27b · HCl	> 10	n. b.	n. b.	> 10
22c · HCl	> 10	n. b.	n. b.	7.578 µM
26c	101%	95%	120%	117%
27c	> 10	n. b.	n. b.	> 10
22d · HCl	> 10	n. b.	n. b.	> 10
26d	> 10	n. b.	n. b.	> 10
27d	107%	105%	118%	114%
22e *	78%	82%	25%	35%
26e	96%	106%	95%	88%
27e	> 10	n. b.	n. b.	> 10
22f	> 10	n. b.	n. b.	> 10
26f	101%	105%	100%	98%
27f	> 10	n. b.	n. b.	> 10
27f · HCl	> 10	n. b.	n. b.	> 10
22g *	64%	81%	13%	20%
27g	89%	88%	75%	83%
27h	> 10	n. b.	n. b.	> 10
32	> 10	> 10	> 10	> 10

^a IC₅₀-Werte [µM] oder Restaktivität [%] der synthetisierten Mannich-Basen bei 10 µM. * Die Verbindungen enthielten eine geringe Menge von Edukt **29** (4–8%, bestimmt mit HPLC, 100%-Methode); n. b. = nicht bestimmt.

Entgegen der aus den Ergebnissen der *docking*-Analysen abgeleiteten Erwartungen konnte für die meisten untersuchten Verbindungen keine nennenswerte Aktivität bei Inkubation mit einer 10 μM oder 1 μM Lösung an den getesteten Proteinkinasen festgestellt werden. Lediglich für Verbindung **22c** · HCl konnte ein IC_{50} -Wert an CLK4 bestimmt werden (IC_{50} -Wert: 7.578 μM). Alle anderen Verbindungen zeigen bei 10 μM keine oder nur eine sehr geringe Inhibition, weshalb keine Bestimmung von IC_{50} -Werten erfolgte. Für die Verbindungen **22e** und **22g** wurden an CLK1 und CLK4 zwar niedrigere Restaktivitäten bestimmt, aber durch eine aus der Synthese stammende Verunreinigung (**22e**, 4–5%; **22g**, 8%; HPLC, 100%-Methode) mit der nachweislich aktiven Verbindung **29** sind diese mit Vorsicht zu betrachten.

Ein Unterschied zwischen einer 6-Chlor- und einer 8-Chlor-Substitution konnte jedoch für die Verbindungen **29** und **30** sowie für die Mannich-Basen **22c**, **22e** und **22g** aufgezeigt werden. Während dort eine Substitution in 8-Position eine Hemmung von CLK1 und CLK4 bewirkte, konnte dies für Verbindungen der Klassen **26** und **27** nicht beobachtet werden. Der Halogen-Substituent in 8-Position führt zu einer Inhibition von CLK1 und CLK4, nicht jedoch von DYRK1A. In den *docking*-Untersuchungen mit **22e** in DYRK1A konnte keine vielversprechende Pose identifiziert werden. Die Bestimmung des Einflusses der verschiedenen basischen Seitenketten auf die Aktivität ist auf der Basis der hier vorgestellten Daten nicht möglich. Da sowohl das 2-Ethyl-imidazol- und das 2-Methyl-imidazol-Derivat (**22g** und **22c**) Aktivitäten an CLK1 und CLK4 zeigten, scheint dieses Strukturmerkmal wichtig für die biologische Aktivität zu sein. 2-(4-Oxo-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-carbazol-3-yl)-acetonitril (**32**) zeigte ebenfalls keine Aktivität (> 10 μM) an DYRK1A oder verwandten Kinasen.

4.5 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der biologischen Testung konnten die Hypothesen, die während der *docking*-Untersuchungen an DYRK1A aufgestellt wurden, für die Auswahl der getesteten Proteinkinasen nicht bestätigen. Eine 8-Chlor-Substitution der 3-Methylencarbazol-4-one zeigte jedoch, dass eine entsprechende Halogen-Substitution zu einer erhöhten Inhibition von DYRK1A führte. Nachfolgende Untersuchungen könnten daher einen Austausch des Chloratoms mit anderen Halogen-Atomen, wie Brom oder Iod bei den 3-Methylencarbazol-4-onen in Betracht ziehen, um den Einfluss des spezifischen Halogens an dieser Position genauer untersuchen zu können. Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Mannich-Basen der Klassen **22**, **26** und **27** konnten nicht als DYRK1A-Inhibitoren identifiziert werden. Die fehlende Hemmaktivität an DYRK1A könnte durch folgende Betrachtungen zu erklären sein. Wie in Kapitel 3.3 bereits aufgezeigt wurde, weist Verbindung **27a** · HCl wahrscheinlich eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung (IWB) zwischen der Carbonyl- und NH⁺-Funktionalität auf. Während der Energieminimierung der untersuchten Liganden im Zuge der Docking-Untersuchungen ergab sich ebenfalls häufig eine IWB bei der Konformation mit der niedrigsten Energie. Für die zunächst als freie Basen eingesetzten Verbindungen, berechnete MOE ^[154] bei pH 7 meist eine Protonierung, sodass auch hier eine IWB möglich wurde (Abbildung 4-2).

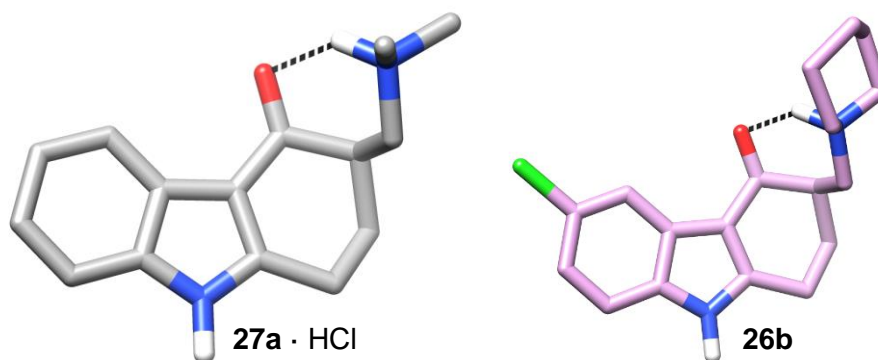


Abbildung 4-2: Darstellung der energieärmsten Konformation (mit MOE ^[154] bestimmt) von **27a** · HCl (grau) und **26b** (pink), die mit Chimera ^[121] visualisiert wurden.

Die Ausbildung einer IWB hat Auswirkung auf die biologische Aktivität, da die Zugänglichkeit der Wasserstoffbrückenakzeptoren und –donatoren beeinträchtigt ist.^[171] Giordanetto *et al.* ^[171] untersuchten systematisch den Einfluss einer IWB und kamen zu der Erkenntnis, dass eine IWB sowohl einen positiven und als auch einen negativen Einfluss auf die biologische Aktivität haben kann. Neben der Maskierung der H-Brückendonatoren und –akzeptoren stellt die

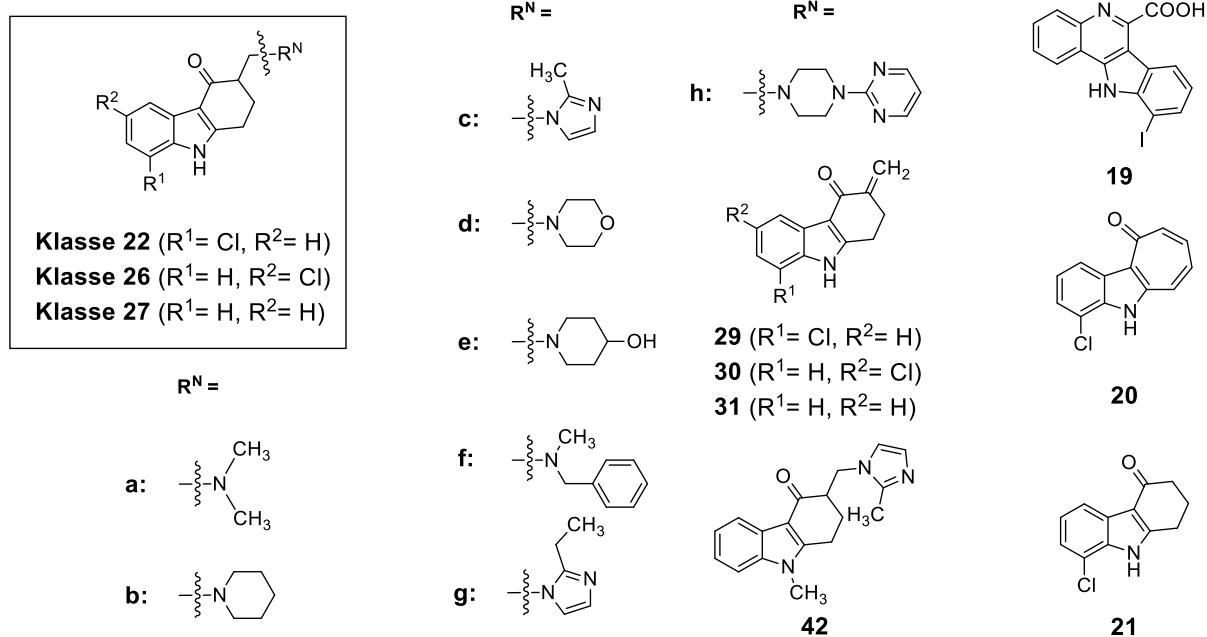
Arbeitsgruppe einen Verlust von Entropie heraus, da durch die stabilisierende Wirkung einer IWB der Übergang in andere Konformationen gestört ist.^[171] Außerdem wird durch eine IWB die Anpassungsfähigkeit an die ATP-Bindetasche reduziert und somit möglicherweise eine potentielle Wechselwirkung zwischen Ligand und Proteinoberfläche verhindert.

Ein weiterer Aspekt wird von RINIKER *et al.* ^[172] herausgestellt. In der ATP-Bindetasche von Proteinkinasen befinden sich häufig Wassermoleküle, die mit der Proteinoberfläche interagieren. Je stärker diese Interaktion ist, desto schwieriger ist es, dieses Wassermolekül aus der Bindetasche zu verdrängen. Die Verdrängung dieser Wassermoleküle durch einen Liganden kann sowohl positive als auch negative Einflüsse auf die Gesamtenthalpie haben.^[172] So wurde gezeigt, dass die Verdrängung von Wassermolekülen mit niedrigerer Bindungsaffinität zur Proteinoberfläche hinsichtlich der Gesamtenthalpie und Gesamtentropie energetisch günstiger ist. In der ATP-Bindetasche von DYRK1A zeigten sich vor den *docking*-Analysen dagegen einige Wassermoleküle, die tief in der ATP-Bindetasche lagen und deren Verdrängung durch die hier getesteten Liganden vermutlich energetisch ungünstiger war. Die lokale Fixierung des Liganden in der ATP-Bindetasche wirkt ebenfalls antientropisch und kann ein weiterer Grund für eine geringere Aktivität sein.^[173] Das Abstreifen der Solvat-Hülle vom Liganden erfordert Energie, die durch den Zuwachs an Entropie vermutlich nicht kompensiert werden kann.^[174] Die entworfenen Mannich-Basen weisen außerdem ein relativ hohes Fsp³-Verhältnis auf, was dem Molekül einen flexibleren Charakter verleiht. Dadurch sind die Moleküle im Vergleich zu den Verbindungen **19–21** deutlich weniger planar, was einen Eintritt in den schmalen Eingang der hydrophoben ATP-Bindetasche von DYRK1A entgegenwirkt. Diese Aspekte könnten mögliche Erklärungen für die geringe biologische Aktivität sein. Kritisch zu betrachten ist vor allem die Rolle des *docking*-Programmes GOLD. In vielen *docking*-Posen wurde die oben beschriebene IWB nicht gefunden, da GOLD durch den GA viele Möglichkeiten der Protein-Ligand-Interaktionen durchgeht und die energetisch günstigere Konformation des Liganden nicht berücksichtigt. Die Anpassungsfähigkeit des Liganden wird von GOLD unter den verwendeten *docking*-Parametern zu hoch eingestuft.

Einige Verbindungen der Klasse **22** führten jedoch zu einer Hemmung an CLK1 und CLK4. Gerade der größere Einfluss auf CLK1 gegenüber der nahverwandten DYRK1A stellt eine attraktive Beobachtung dar. Aufgrund der fehlenden Aktivität an DYRK1A wurde die geplante Trennung der hier synthetisierten Gemische von Stereoisomeren nicht durchgeführt. Auch eine Co-Kristallstruktur mit einer im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindung wurde nicht erhalten.

5 Physikochemische Eigenschaften

Zur Beurteilung der physikochemischen Eigenschaften wurden ausgewählte Parameter für Endstufen und Zwischenverbindungen ermittelt. Dabei sollten Vergleiche zwischen den von FALKE synthetisierten Verbindungen **19–21** gezogen werden. Der clogP-Wert wurde mit dem Programm Marvin Sketch ^[142] und der clogS-Wert mit einer implementierten Funktion von SwissADME ^[143] vorhergesagt. Die Parameter der RO5 und die Anzahl rotierbarer Bindungen wurden mit SwissADME ^[143] bestimmt. Die Anzahl aromatischer Ringe, der Fsp³-Wert, logS_Y (nach YALKOWSKY ^[140]) und der Schmelzpunkt wurden ebenfalls bestimmt. Aufgrund fehlender Permeabilitätsuntersuchen wurde keine Einteilung in das BCS vorgenommen. LE- und LLE-Werte können erst ersten nach biologischer Testung bestimmt werden und wurden damit nicht vorhergesagt. Die thermodynamische und kinetische Löslichkeit wurden im weiteren Verlauf repräsentativ für ausgewählte Verbindungen bestimmt. Alle vorhergesagten physikochemischen Eigenschaften für **19–21** und die daraus abgeleiteten Endstufen dieser Arbeit sind in Tabelle 5-1 aufgeführt. Außerdem wurden die physikochemischen Eigenschaften für das Arzneistoffbeispiel Ondansetron (**42**) und dessen Hydrochlorid vorhergesagt. Die Strukturen der Verbindungen sind in Schema 5-1 dargestellt. Die physikochemischen Eigenschaften der Endstufen, die in Hydrochloride umgewandelt wurden, wurden für das entsprechende Salz vorhergesagt und sind in Tabelle 5-1 entsprechend gekennzeichnet.



Schema 5-1: Darstellung der Strukturen, deren physikochemische Eigenschaften im Verlauf dieser Arbeit untersucht wurden.

Tabelle 5-1: Vorhergesagte physikochemische Eigenschaften und experimentell bestimmte Schmelzpunkte für die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Verbindungen.

	clogP ^a	M _r [g/mol] ^b	HA/HD ^b	RB ^b	Ar	Fsp ^{3b}	Schmp. [°C] ^c	clogS ^d	logS _Y ^e
19	4.24	388.16	3/2	0	4	0.00	359 ^[145]	-6.25	-7.08
20	2.79	229.66	1/1	0	3	0.00	357 ^[145]	-5.91	-5.63
21	2.19	219.67	1/1	0	2	0.25	267 ^[145]	-4.90	-4.11
22a · HCl	-1.65	313.22	1/2	2	2	0.40	203	-5.18	0.37
26a · HCl	-1.65	313.22	1/2	2	2	0.40	225	-5.18	0.15
27a · HCl	-2.17	278.28	1/2	2	2	0.40	198	-4.75	0.67
22b · HCl	-0.93	353.29	1/2	2	2	0.50	216	-5.78	-0.48
26b	2.89	316.83	2/1	2	2	0.50	194	-5.78	-4.08
27b · HCl	-1.45	318.84	1/2	2	2	0.50	220	-5.18	0
22c · HCl	1.00	350.24	1/2	2	3	0.29	175	-5.97	-2
26c	2.29	313.78	1/2	2	3	0.29	202	-5.97	-3.56
27c	1.77	279.34	3/1	2	3	0.29	204	-5.37	-3.06
22d · HCl	-2.00	355.26	2/2	2	2	0.47	224	-5.25	0.51
26d	1.83	318.80	3/1	2	2	0.47	217	-5.24	-3.25
27d	1.31	284.35	3/1	2	2	0.47	224	-4.64	-2.80
22e	1.42	312.41	3/2	2	2	0.50	127	-4.96	-1.94
26e	1.42	312.41	3/2	2	2	0.50	149	-4.96	-2.16
27e	0.90	298.38	3/2	2	2	0.50	197	-4.36	-2.12
22f	3.94	352.86	2/1	4	3	0.29	162	-7.67	-4.81
26f	3.94	352.86	2/1	4	3	0.29	185	-7.67	-5.04
27f	3.43	318.41	2/1	4	3	0.29	158	-7.08	-4.26
27f · HCl	-0.40	354.87	1/2	4	3	0.29	193	-7.08	-0.78
22g	2.92	327.81	2/1	3	3	0.33	128	-6.37	-3.45
27g	2.40	293.36	2/1	3	3	0.33	209	-5.77	-3.74
27h	2.15	361.44	4/1	3	3	0.38	171	-5.96	-3.11
42	2.02	293.66	2/0	2	3	0.33	228	-4.93	-3.55
42 · HCl Dihydrat	0.73	365.85	1/1	2	3	0.33	179	-4.93	-1.77

a) Berechnet mit Marvin Sketch ^[142] b) Bestimmt mit SwissADME^[143], HA: Anzahl der Wasserstoffbrückenakzeptoren, HD: Anzahl der Wasserstoffbrückendonatoren, RB: Anzahl der rotierbaren Bindungen, Ar: Anzahl aromatischer Ringsysteme c) Obere Grenze des Schmelzintervalls des experimentell bestimmten Schmp. oder Zers.-Temperatur d) Vorhergesagt mit der Silicos-IT Methode nach SwissADME ^[143] e) vorhergesagte Löslichkeit nach YALKOWSKY^[140] mit der oberen Grenze des Schmelzintervalls.

Die vorhergesagten clogP-Werte stützen sich vor allem auf Strukturmerkmale der Verbindungen. Hat eine Verbindung mehr aromatische Ringsysteme, so ist der vorhergesagte clogP-Wert stets höher (vgl. **22f** und **22g**). Gleiches gilt für Verbindungen, die nicht als Hydrochlorid gefällt wurden (vgl. **27f** und **27f** · HCl). Proteinkinase-Inhibitoren zeichnen sich durch eher lipophile Eigenschaften aus, da die die Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche einen solchen Charakter aufweist.^[125] So weist auch der potente DYRK1A-Inhibitor **19** mit einem clogP-Wert von 4.24 eine hohe Lipophilie auf, die nah an dem Grenzwert von 5 gemäß der *rule of five* nach Lipinski liegt. Trotz der hohen *in vitro* Hemmaktivität am isolierten Enzym konnte in zellbasierten Assays lediglich eine geringe Aktivität gemessen werden.^[50] Vermutlich liegt dies an den unvorteilhaften physikochemischen Eigenschaften, insbesondere der niedrigen Löslichkeit im wässrigen Zellmedium. Neben dem stark aromatischen Charakter von **19** ist der Fsp³-Wert zu niedrig. Die flache Grundstruktur führt zwar zu einer hohen Hemmaktivität, im Gegenzug aber zu einer schlechten Wasserlöslichkeit. Sinkt durch die strukturelle Abwandlung der aromatische Charakter bzw. steigt der Fsp³-Wert einer *hit*-Struktur, dann sinkt häufig auch die Aktivität, was sich für **20** und **21** bestätigen lässt.

Durch die Einführung von basischen Seitenketten in 3-Position der Verbindung **21** sollten Hydrophilie und Ionisierbarkeit der Verbindungen gesteigert werden. Dementsprechend zeigten die Mannich-Basen mit einem geringeren aromatischen Charakter häufig eine bessere vorhergesagte Löslichkeit (Silicos-IT und YALKOWSKY^[140]) als Verbindung **19** und **20** oder einen kleineren clogP-Wert als **19–21**. Die Umwandlung der freien Base in das jeweilige Hydrochlorid sorgte in den theoretischen Betrachtungen für eine Verbesserung. Ondansetron (**42**) ist als Hydrochlorid ein zugelassener oral bioverfügbarer Arzneistoff. Für die freie Base ergeben sich vergleichbare vorhergesagte physikochemische Eigenschaften wie für die in der vorliegenden Arbeit designten Mannich-Basen. Verbindungen mit dem Substituenten **f** zeigten durch den lipophilen *N*-Benzylmethyl-Rest ähnliche Eigenschaften wie Verbindung **19**. Durch Umwandlung in das Hydrochlorid sinkt die Lipophilie, wodurch auch die nach YALKOWSKY^[140] vorhergesagte Löslichkeit steigt (Beispiel: **27f** und **27f** · HCl). Verbindungen mit den Substituenten **a** (Dimethylamin) oder **b** (Piperidin) ergaben neben der Base von Ondansetron die besten vorhergesagten physikochemischen Eigenschaften dieser Reihe. Für die 3-Methylencarbazol-4-one wurden die physikochemischen Eigenschaften ebenfalls vorhergesagt (Tabelle 5.2).

Tabelle 5-2: Vorhergesagte physikochemische Eigenschaften und experimentell bestimmte Schmelzpunkte für die 3-Methylencarbazol-4-one **29–31**.

	clogP ^a	M _r [g/mol] ^b	HA/HD ^b	RB ^b	Ar	Fsp ^{3 b}	Schmp.[°C] ^c	clogS ^d	logS _y ^e
29	2.59	231.68	1/1	0	2	0.15	227	-5.29	-4.11
30	2.59	231.68	1/1	0	2	0.15	259	-5.29	-4.43
31	2.07	219.67	1/1	0	2	0.15	208	-4.67	-3.40

a) Berechnet mit Marvin Sketch ^[142] b) Bestimmt mit SwissADME^[143], HA: Anzahl der Wasserstoffbrückenakzeptoren, HD: Anzahl der Wasserstoffbrücken Donatoren, RB: Anzahl der rotierbaren Bindungen, Ar: Anzahl aromatischer Ringsysteme c) Obere Grenze des Schmelzintervalls des experimentell bestimmten Schmp. oder Zers.-Temperatur d) Vorhergesagt mit der Silicos-IT Methode nach SwissADME ^[143] e) vorhergesagte Löslichkeit nach YALKOWSKY^[140] mit der oberen Grenze des Schmelzintervalls.

Im Allgemeinen zeigten die Verbindungen **29–31** ähnliche Eigenschaften wie die Verbindungen **20** und **21**. In den Betrachtungen der zahlreichen Beispiele fiel auf, dass häufig die 6-Chlor-Verbindung einen höheren Schmelzpunkt als die entsprechende 8-Chlor-Verbindung aufwies. Zudem konnte beobachtet werden, dass eine Umwandlung in das Hydrochlorid erwartungsgemäß zu einer Erhöhung des Schmelzpunktes bei **27f** führte (Tabelle 5-1).

5.1 Löslichkeit

Für ausgewählte Beispiele der synthetisierten neuen Testverbindungen wurden die thermodynamische und die kinetische Löslichkeit bestimmt. Vertreter jeder Gruppe wurden für die Löslichkeitsuntersuchungen ausgewählt und mit Verbindung **19** und **20** verglichen.^[144] Verbindung **20** und die Zwischenprodukte **29–31** sollten dabei Stellvertreter aus der Gruppe ohne basische Seitenkette sein. Verbindungen mit Substituent **b** (**22b** · HCl, **26b**, **27b** · HCl, Piperidin) sollten Stellvertreter der Gruppe mit vielversprechenden physikochemischen Eigenschaften darstellen. Ihnen gegenüber sollten Verbindungen mit Substituent **f** (**22f**, **26f** und **27f**, *N*-Benzylmethylamin) stehen, für die eine schlechte Löslichkeit erwartet wurde. Ondansetron (**42**) als Analogstruktur sollte als Arzneistoffbeispiel ebenfalls untersucht werden. Da einige Verbindungen aus Stabilitätsgründen als Hydrochloride isoliert wurden, sollte der Einfluss der Salzbildung anhand von zwei Beispielen ebenfalls untersucht werden. Dies wurde durch den Vergleich der kinetischen und thermodynamischen Löslichkeit der freien Base und des Hydrochlorids von **27f** und **42** realisiert. Der Vergleich zwischen verschiedenen basischen Seitenketten wurde mit **26b** (Piperidin), **26d** (Morpholin), **26e** (4-Hydroxypiperidin) und **26f** (*N*-Benzylmethylamin) betrachtet, wobei erwartet wurde, dass der Substituent **f** die schlechteste Löslichkeit zeigen würde.

Die kinetische und thermodynamische Löslichkeit wurde bei pH 7.4 bestimmt, da dies dem physiologischen pH-Wert nahekommt. Arzneistoffe werden häufig zwischen pH 6 und 8 resorbiert.^[175] Die angestrebte Löslichkeit liegt bei 200 µM, bereits ab 30 µM kann die Löslichkeit als moderat eingestuft werden. Der pH-Wert beeinflusst die Löslichkeit dahingehend, dass durch Protonierung bzw. Deprotonierung eine neutrale Substanz in ein besser lösliches Kation oder Anion umgewandelt werden kann. Die intrinsische Löslichkeit gibt die Löslichkeit der nicht dissoziierten freien ungeladenen Säure bzw. Base an. Für die isolierten Salze ergibt sich die experimentell bestimmte Gesamtlöslichkeit aus der intrinsischen Löslichkeit und der Löslichkeit des entsprechenden Kations. Die Vorhersage der Löslichkeit nach der Silicos-IT-Methode berücksichtigt jedoch nicht den Protonierungsgrad der einzelnen Verbindung. Daher ergibt sich für die Verbindung **27f** der gleiche clogS wie für das Hydrochlorid **27f** · HCl, da die intrinsische Löslichkeit für die Neutralsubstanz vorhergesagt wird. Die nach YALKOWSKY^[140] ermittelte Löslichkeit berücksichtigt jedoch neben dem Schmelzpunkt auch den Protonierungsgrad der Verbindung durch den vorhergesagten clogP-Wert. Aus diesem Grund ergibt sich trotz des höheren Schmelzpunktes eine höhere vorhergesagte Löslichkeit für **27f** · HCl, da der clogP-Wert deutlich kleiner ist. Die Bestimmung der kinetischen und thermodynamischen Löslichkeit betrachtet im weiteren Verlauf die Gesamtlöslichkeit. Die untersuchten basischen aliphatischen Amine liegen bei der Bestimmung bei physiologischem pH-Wert teilweise oder vollständig protoniert vor. Aus diesem Grund sollte die Löslichkeit im Zusammenhang mit dem pH-Wert angegeben werden. Der Vergleich der Löslichkeit zwischen Salz und freier Base sollte besonders vorsichtig geschehen, da zum einen der Untersuchungslösung zum Zweck der Messung ionische Zusätze zugeführt werden und zum anderen der pH-Wert der Lösung durch Zusatz des Analyten verändert werden kann. Diese Aspekte werden durch einige Löslichkeitsvergleiche zwischen Salz und freier Base aufgezeigt, bei denen das Hydrochlorid häufig eine höhere Löslichkeit zeigt.^{[175]–[177]} In einigen Fällen zeigte jedoch auch die freie Base eine höhere Löslichkeit, da durch ionische Zusätze (z. B. Cl[–]) das Löslichkeitsprodukt des Hydrochlorids überschritten wurde. Umgekehrt gilt für die Bestimmung freier Basen, dass der pH-Wert in der gepufferten Lösung nicht zu hoch werden darf, da die Löslichkeit dann rapide absinkt.^[177] Die Probleme, die beim Vergleich der Löslichkeit zwischen der freien Base und ihrem Salz bestehen, werden von einigen Veröffentlichungen diskutiert.^{[178],[179]} Auch die USP (*The United States Pharmacopeia*) zeigt diese auf.^[180]

Bei thermodynamischen Löslichkeitsmessungen wird die Löslichkeit eines Feststoffes im Gleichgewicht zu einem Bodensatz bestimmt. Die Menge, die zur Erzeugung dieses Bodensatzes notwendig ist, ist stoffspezifisch. Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, da für die Erzeugung eines Bodensatzes mit einem Hydrochlorid häufig mehr Substanz verwendet wurde und somit der Einfluss auf die Ionenstärke und den pH-Wert größer war. Berücksichtigt werden sollte des Weiteren die Kapazität des verwendeten Puffers. Starke Abweichungen des pH-Wertes führen bei Basen oder Säuren zwangsläufig zu einer Veränderung der Löslichkeit. So veränderte sich der pH-Bereich bei der Löslichkeitsbestimmung von Ibuprofen bei der Verwendung von acht zur Bestimmung der Löslichkeit geläufigen Puffern.^[181] Häufig treten große Unterschiede der Löslichkeit abhängig vom verwendeten Puffersystem auf, weshalb eine Vergleichbarkeit der verwendeten Bestimmungsmethoden nicht unmittelbar gegeben ist. In der Regel werden Puffersysteme in einem pH-Bereich von 1–7.6 verwendet. Die Spannweite reicht dabei von sehr einfachen Puffersystem zu hochkomplexen.^[181] In der hier vorgelegten Arbeit wurde ein einfacher natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer (Dihydrogenphosphat/Monohydrogenphosphat) aus dem europäischen Arzneibuch für die Bestimmung aller thermodynamischen Löslichkeiten eingesetzt. LEVIS *et al.* ^[181] zeigten, dass die Löslichkeit von Ibuprofen in diesem Puffersystem unter den Vergleichssystemen am höchsten war. Allerdings unterschied sich der von der Arbeitsgruppe verwendete Puffer in der Molarität. So wies die Molarität des für die Messung verwendeten Arzneibuch-Puffers für die Pufferkomponente Dihydrogenphosphat 1.40 mM und für Monohydrogenphosphat 6.65 mM auf. LEVIS *et al.* verwendeten einen Phosphatpuffer mit den Konzentrationen 13.46 mM (Dihydrogenphosphat) und 53.31 mM (Monohydrogenphosphat).^[181] Die Arbeitsgruppe gab für dieses Puffersystem eine Löslichkeit von 6.02 mg/mL (~ 29 mM) für Ibuprofen an. Dabei verschob sich der pH-Wert um ca. eine Einheit ins saure Milieu (pH 7.21 auf pH 6.35). Diese pH-Wert-Änderung wird durch die Pufferkapazität, einen weiteren wichtigen Parameter, charakterisiert. Die Pufferkapazität gibt an, wie viel Äquivalente einer starken Säure bzw. Base notwendig sind um den pH-Wert des Puffersystems um eine pH-Einheit zu verändern.^[181]

Diese Betrachtungen zeigen, dass die Menge, die zur Erzeugung eines Bodensatzes notwendig ist ebenso wie der verwendete Puffer einen Einfluss auf die Bestimmung der thermodynamischen Löslichkeit haben. Die in dieser Arbeit hinsichtlich der thermodynamischen Löslichkeit untersuchten Hydrochloride sind mutmaßlich deutlich weniger sauer als Ibuprofen, weshalb die pH-Wert-Verschiebung in den sauren Bereich als unkritisch eingestuft wurde. Eine Bestimmung des pH-Wertes während der Löslichkeitsmessungen war aus messtechnischen Gründen nicht möglich. Aus diesem Grund sollten die Löslichkeiten der in dieser Arbeit untersuchten Hydrochloride entsprechend bewertet werden.

Die Bestimmung der thermodynamischen Löslichkeit eignet sich aus diesem Grund eher für aprotische und schlechter lösliche Analyten. Die gewünschte Löslichkeit von 200 μM wird für die untersuchten Hydrochloride weit überschritten. Diese Problematik wurde jedoch nur für die untersuchten Hydrochloride festgestellt, da zur Erzeugung eines Bodensatzes eine besonders große Menge (ca. 10 mg) in 300 μL des verwendeten Phosphatpuffers gegeben wurden.

5.1.1 Kinetische und thermodynamische Löslichkeit

In dieser Arbeit wurden die kinetischen und thermodynamischen Löslichkeiten bestimmt. Die kinetische Löslichkeit beschreibt nicht die Löslichkeit im Gleichgewicht, sondern die Löslichkeit der am schnellsten ausfallenden Form einer Verbindung. Dazu wurde die entsprechende Verbindung exakt eingewogen und in einer definierten Menge DMSO aufgenommen. Aus dieser Stammlösung wurden zwei Verdünnungsreihen erstellt. Ein definiertes Volumen dieser Verdünnungsreihe (5 μL) wurde jeweils in die Kavitäten einer 96-well-plate pipettiert, die mit 195 μL eines natriumchloridhaltigen Phosphatpuffers (pH 7.4) befüllt waren. Diese Mixturen enthielten also 2.5% DMSO, was bei der Bestimmung der kinetischen Löslichkeit ein akzeptabler Wert ist. In der Literatur wurden Werte zwischen 2 und 5% der jeweiligen DMSO-Konzentrationen gefunden, wobei eine niedrigere Konzentration vorteilhafter für die Aussagekraft der Untersuchungsergebnisse ist.^{[129],[130]} Die Vermessung innerhalb des einzelnen wells erfolgte mit einem Nephelometer, welches durch Bestrahlung der Probe mit einem Laser die Streuung durch ungelöste Partikeln misst. Die Intensität der Streuung ist dabei proportional zur Menge an ungelöstem Feststoff und wird als *relative nephelometric turbidity unit* (NTU) angegeben. Bei einer vollständigen Lösung wird ein Wert nahe dem Blind-Wert gemessen. Zur Auswertung wird die Intensität in Korrelation zu der Konzentration gesetzt, wodurch zwei Geraden erhalten werden. Im Bereich der niedrigeren Konzentrationen ergibt sich eine Gerade, die nahezu parallel zur X-Achse verläuft. Die NTU-Werte lagen zumeist unter 10000 NTU. Bei beginnender Präzipitation ergab sich eine Gerade, die NTU-Werte im hohen sechsstelligen Bereich beinhaltete. Die Linearität dieser Methode war jedoch beschränkt, da sich durch Sättigungseffekte bei hohen Konzentrationen ähnliche NTU-Werte ermitteln ließen. Diese Methode ist wenig robust in Bezug auf die Qualität der eingesetzten Mikrotiterplatten, weshalb die Platte im Vorfeld leer vermessen wurde. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern, wurden lediglich Felder (Kavitäten) mit einer Eigenstreuung von unter 4000 NTU für die Messungen verwendet. Drei Felder mit besonders geringer Eigenstreuung wurden für die Blindmessung verwendet. Durch Berechnung der Steigung und des Achsenabschnittes aller Werte ergaben sich für die zugeordneten Messwerte zwei Geradengleichungen, die mathematisch gleichgesetzt wurden. Für beide Verdünnungsreihen wurden so die Schnittpunkte ermittelt und der Mittelwert der entsprechenden Konzentrationen

als die kinetische Löslichkeit angegeben. Beispielhaft soll dieses Vorgehen an einer Messreihe von Verbindung **27f** verdeutlicht werden (Abbildung 5-1).

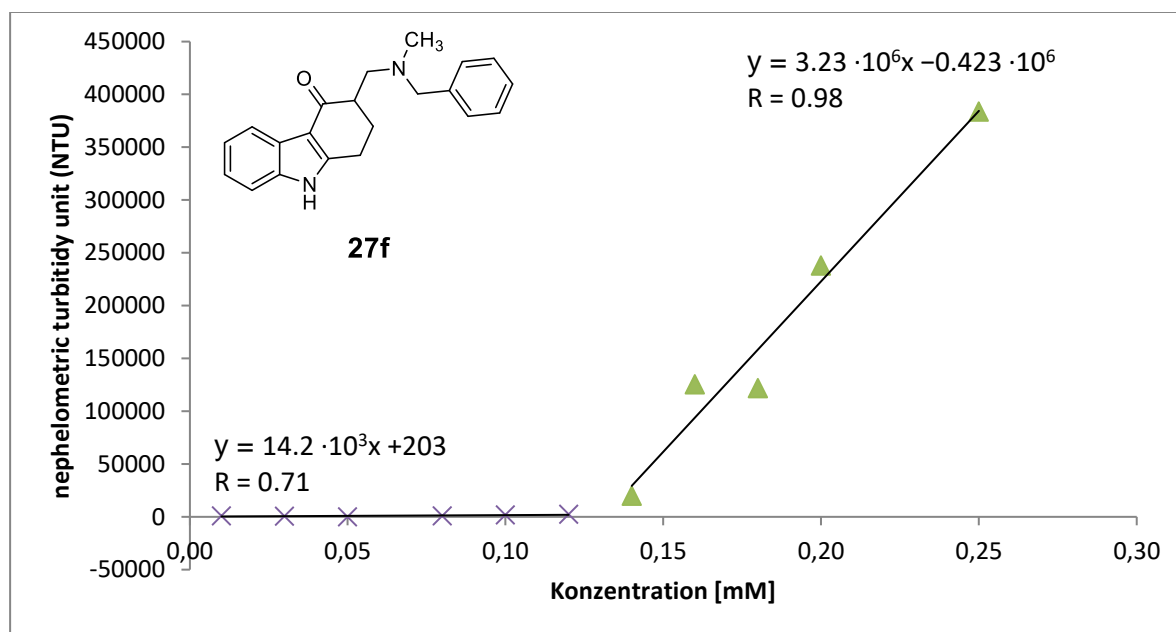


Abbildung 5-1: Bestimmung der kinetischen Löslichkeit von Verbindung **27f** mittels Nephelometrie. X-Achse: Konzentration in mmol/L, Y-Achse: Intensität des Streulichtes (NTU). Für Gerade A (Kreuze) wurden Messwerte mit geringem NTU ausgewählt. Gerade B (Dreiecke) zeigte linearen Anstieg der NTU-Werte. Die Trendlinien wurden zur Visualisierung gezeigt. Die Berechnung der Geradengleichung erfolgte aus den Einzelwerten. Der Schnittpunkt in diesem Beispiel lag bei $x = 0,13039$ mM.

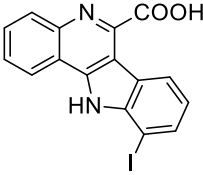
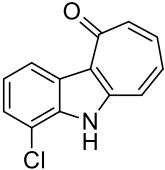
Bei der Bestimmung der thermodynamischen Löslichkeit wird die maximal erreichbare Konzentration der thermodynamisch stabilsten Form im Gleichgewicht zu einem Bodensatz in einer Lösung bestimmt. Diese erfolgte mit einer etablierten *shake flask*-Methode nach WÖLFEL^[182]. In einen Whatman Mini-UniPrep Filter wurden 300 μ L eines natriumchloridhaltigen Phosphatpuffers (pH 7.4) gegeben. Es wurde solange Substanz hinzugesetzt bis sich ein Bodensatz bildete. Die Proben wurden anschließend für 24 oder 48 h in einem Schüttelinkubator bei 25 °C und 400 rpm inkubiert. Für beide Inkubationszeiten wurden zwei unabhängige Proben vorbereitet, wodurch vier Proben erhalten wurden. Um die Löslichkeit im Gleichgewicht zu bestimmen, wurde der Bodensatz nach der Inkubationszeit abfiltriert und das Filtrat mittels Puffer-HPLC vermessen. Zur Bestimmung der Konzentration wurde für jede untersuchte Verbindung eine separate Kalibriergerade mit derselben HPLC-Methode erstellt. Es zeigten sich lediglich geringere Veränderungen für die einzelnen Inkubationszeiten, sodass keine weitere Messung nach 72 h durchgeführt wurde. In einigen Fällen war die Löslichkeit jedoch so hoch, dass das Filtrat verdünnt werden musste. Für die quantitative UV-Auswertung wurden zwei Wellenlängen verwendet (254 nm und 280 nm), die bei allen Proben unverändert blieben. Thermodynamische Löslichkeiten, die unterhalb der niedrigsten zur Erzeugung der

Kalibriergeraden eingesetzten Konzentration (5 μM) lagen, konnten nicht mit hinreichender Präzision bestimmt werden und wurden daher mit < 5 μM angegeben.

5.1.2 Interpretation der ermittelten Löslichkeit

Zunächst wurden die kinetischen und thermodynamischen Löslichkeiten sowie die LLE-Werte für DYRK1A von Verbindung **19** und **20** miteinander verglichen (Tabelle 5-3).

Tabelle 5-3: Vergleich der physikochemischen Eigenschaften von **19** und **20**.

	clogP ^a	LLE ^b (DYRK1A)	S _y [μM] ^c	cS [μM] ^c	S _{exp., therm., pH 7.4} [μM] ^d	S _{exp., kin., pH 7.4} [μM] ^e
 19	4.24	3.98	$83.2 \cdot 10^{-3}$	0.56	< 5	5.28 (4.99–5.57) [144]
 20	2.79	3.91	2.34	1.2	< 5	34.4 (26.5–42.2)

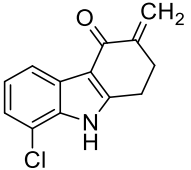
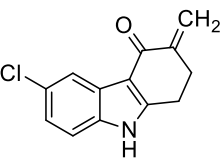
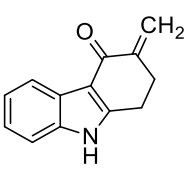
a) clogP berechnet mit Marvin Sketch ^[142], b) Berechneter LLE-Wert nach Formel 1-4, wobei der berechnete clogP-Wert verwendet wurde, c) Vorhergesagte Löslichkeit nach YALKOWSKY ^[140] und SwissADME (Silicos-IT) ^[143] d) Experimentell bestimmte thermodynamische Löslichkeit bei 254 nm, e) Experimentell bestimmte kinetische Löslichkeit. Mittelwert aus zwei Messungen, Spannweite in Klammern.

Obwohl Verbindung **20** eine deutliche geringe Hemmaktivität im Vergleich zu **19** an DYRK1A aufweist (vgl. Kapitel 4), sind die LLE-Werte beider Verbindungen sehr ähnlich. Dies liegt an dem deutlich geringeren berechneten Verteilungskoeffizienten von Verbindung **20**. Der mindestens geforderte LLE-Wert von 5 wurde in beiden Fällen nicht erreicht. Bei der Fragment-basierten Silicos-IT-Methode zur Berechnung der Wasserlöslichkeit werden einzelnen Gruppen im Molekül unterschiedliche Einflüsse auf die Löslichkeit zugeteilt. So zeigen beispielsweise polare NH₂- und OH-Gruppen einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit, während aliphatische Seitenketten, Halogene oder Aromaten die Berechnung der Löslichkeit negativ beeinflussen. Außerdem wird die relative Molmasse berücksichtigt. Silicos-IT sagte für **20** im Vergleich zu **19** eine bessere Wasserlöslichkeit voraus, was auch für die Berechnung nach YALKOWSKY ^[140] zutraf. Bei beiden Verbindungen zeigte sich eine

thermodynamische Löslichkeit, die unterhalb der festgelegten Bestimmungsgrenze von 5 μM lag. Die experimentell ermittelte kinetische Löslichkeit von Verbindung **20** war im Vergleich zu **19** etwa um den Faktor fünf größer, was die vorhergesagten Werte bestätigte. Allerdings wurde die kinetische Löslichkeit von **19** bei MEINE ^[144] mit einer DMSO-Konzentration von 1% bestimmt.

Im Anschluss wurden die ermittelten Eigenschaften der synthetisierten 3-Methylen-carbazol-4-one **29**, **30** und **31** miteinander verglichen (Tabelle 5-3).

Tabelle 5-4: Vergleich der physikochemischen Eigenschaften von **29**, **30** und **31**.

	clogP ^a	S _y [μM] ^b	cS [μM] ^b	S _{exp., therm., pH 7.4} [μM] ^c	S _{exp., kin., pH 7.4} [μM] ^d
 29	2.59	77.6	5.13	26.8 (26.7–26.9)	186 (133–239)
 30	2.59	37.2	5.13	1.75 (1.69–1.81)	21.3 (15.6–26.9)
 31	2.07	398	21.4	106 (106–106)	620 (620–620)

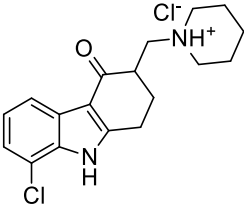
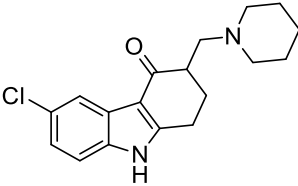
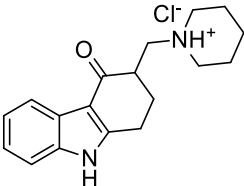
a) Berechneter Verteilungskoeffizient mit Marvin Sketch ^[142], b) Vorhergesagte Löslichkeit nach YALKOWSKY ^[140] und SwissADME (Silicos-IT) ^[143], c) Experimentell bestimmte thermodynamische Löslichkeit bei 254 nm, d) Experimentell bestimmte kinetische Löslichkeit. Mittelwert aus zwei Messungen, Spannweite in Klammern.

Der vorhergesagte clogP-Wert war für alle Verbindungen dieser Reihe im Vergleich zu **19** und **20** verbessert. Der Chlor-Substituent führte bei der Berechnung des clogP-Wertes für die Verbindungen **29** und **30** im Vergleich zu **31** zu einem höheren Wert. Ebenso verhält es sich bei der vorhergesagten Löslichkeit nach YALKOWSKY^[140] und durch Silicos-IT. Der LLE-Wert von Verbindung **29** (3.17, hier nicht gezeigt) ist ebenfalls mit dem von **19** und **20** vergleichbar.

Für die Verbindungen **29–31** konnte unterhalb von 5 µM eine Kalibrierung durchgeführt werden, weil auch sehr niedrige Konzentrationen auswertbare Signale in den HPLC-Chromatogrammen ergaben. Während für die 6-Chlor-Verbindung **30** vergleichbare kinetische und thermodynamische Löslichkeiten wie bei **20** festgestellt werden konnten, zeigten **29** und **31** verbesserte Löslichkeiten. Der Chlor-Substituent zeigte in beiden Fällen einen negativen Einfluss auf die kinetische und thermodynamische Löslichkeit im Vergleich zu **31**, das in dieser Reihe die beste Löslichkeit aufwies. Erwähnenswert ist, dass ein 8-Chlor-Substituent im Vergleich mit einem 6-Chlor-Substituenten einen positiven Einfluss auf die kinetische und thermodynamische Löslichkeit hatte. Dies bestätigte sich auch nach der YALKOWSKY-Gleichung ^[140]. Die kinetische Löslichkeit war in allen Fällen höher als die thermodynamische Löslichkeit.

In Tabelle 5-5 sind die Löslichkeiten der Verbindungen mit einer Piperidin-Seitenkette (**22b** · HCl, **26b** und **27b** · HCl) zusammengefasst.

Tabelle 5-5: Vergleich der physikochemischen Eigenschaften von **22b** · HCl, **26b** und **27b** · HCl.

	clogP ^a	S _y [μM] ^b	cS [μM] ^b	S _{exp., therm., pH 7.4} [μM] ^c	S _{exp., kin., pH 7.4} [μM] ^d
 22b · HCl	-0.93	331 · 10 ³	1.66	13.9 · 10 ³ (11746–16130)	2.34 · 10 ³
 26b	2.89	83.2	1.66	178 (158–197)	83.2 (75.8–90.6)
 27b · HCl	-1.45	1.00 · 10 ⁶	6.61	19.9 · 10 ³ (19197–20545)	>2.50 · 10 ³

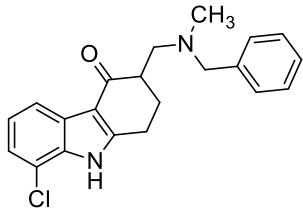
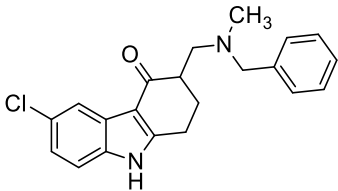
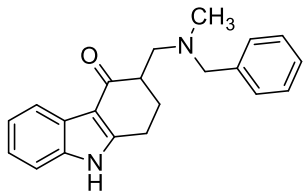
a) Berechneter Verteilungskoeffizient mit Marvin Sketch ^[142] b) Vorhergesagte Löslichkeit nach YALKOWSKY ^[140] und SwissADME (Silicos-IT) ^[143], c) Experimentell bestimmte thermodynamische Löslichkeit bei 254 nm, d) Experimentell bestimmte kinetische Löslichkeit. Mittelwert aus zwei Messungen, Spannweite in Klammern.

Verbindung **22b** und **27b** lagen für die Löslichkeitsmessungen als Hydrochloride (· HCl) vor. Verbindung **26b** wurde als freie Base während der Synthese erhalten. Daher zeigte der clogP-Wert bei Verbindung **26b** den höchsten Wert in dieser Reihe. Für das Hydrochlorid der nicht substituierten Verbindung **27b** war der clogP-Wert am niedrigsten, was in der höchsten vorhergesagten Löslichkeit resultierte. Für die Messung der thermodynamischen Löslichkeit mussten die Proben für die HPLC-Analytik verdünnt werden. Da Verbindung **26b** nicht als Hydrochlorid vorlag, zeigten sowohl die kinetische als auch die thermodynamische Löslichkeit niedrigere Werte als für die vermessenen Hydrochloride gefunden wurde. Im Vergleich zu den 3-Methylen-carbazol-4-onen aus Tabelle 5-4 zeigten sich trotz der vergleichbaren vorhergesagten Eigenschaften jedoch deutlich verbesserte Löslichkeiten im Vergleich zu den Zwischenstufen **29–31**. Die kinetische Löslichkeit war in allen Fällen niedriger als die thermodynamische Löslichkeit.

Dies kann durch den hohen Probeneinsatz bei der thermodynamischen Löslichkeit (pH-Änderung) und durch den Einsatz einer hochkonzentrierten Stammlösung zur Bestimmung der kinetischen Löslichkeit begründet werden. Eine Stammlösung für die genauere Untersuchung der kinetischen Löslichkeit im Bereich von höheren mM-Konzentrationen konnte nicht mehr hergestellt werden. Es zeigte sich außerdem, dass die vorhergesagten Werte (Silicos-IT) für **22b** · HCl und **27b** · HCl und die YALKOWSKY vorausgerechneten Werte sich tendenziell analog wie die experimentell bestimmten Löslichkeiten verhielten. Der Einfluss der Chlor-Substitution konnte in dieser Betrachtung nicht näher untersucht werden.

Die Verbindungen mit Aminkomponente **b** (Piperidin) sollten im nächsten Schritt mit Verbindungen mit Aminkomponente **f** (Benzylmethylamin) verglichen werden, da sich die vorhergesagten physikochemischen Eigenschaften beider Spezies deutlich voneinander unterschieden (Tabelle 5-6).

Tabelle 5-6: Vergleich der physikochemischen Eigenschaften von **22f**, **26f** und **27f**.

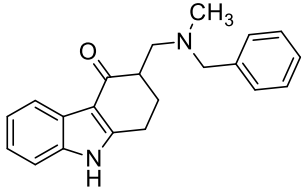
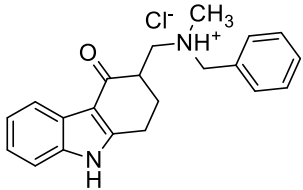
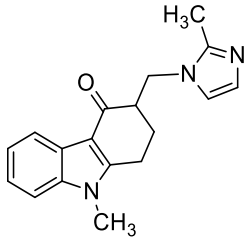
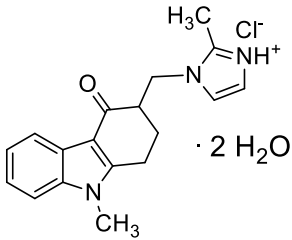
	clogP ^a	S _y [μM] ^b	cS [μM] ^b	S _{exp., therm., pH 7.4} [μM] ^c	S _{exp., kin., pH 7.4} [μM] ^d
 <p>22f</p>	3.94	15.5	21.3·10 ⁻³	< 5	49.1 (48.6–49.6)
 <p>26f</p>	3.94	9.12	21.3·10 ⁻³	< 5	15.3 (11.8–18.7)
 <p>27f</p>	3.44	55.0	83.1·10 ⁻³	24.3 (21.9–26.6)	131 (130–132)

a) Berechneter Verteilungskoeffizient mit Marvin Sketch ^[142], b) Vorhergesagte Löslichkeit nach YALKOWSKY ^[140] und SwissADME (Silicos-IT) ^[143], c) Experimentell bestimmte thermodynamische Löslichkeit bei 254 nm, d) Experimentell bestimmte kinetische Löslichkeit. Mittelwert aus zwei Messungen, Spannweite in Klammern.

Da alle Verbindungen mit der Aminkomponente **f** als freie Base vorlagen, war eine bessere Vergleichbarkeit gegeben. Erwartungsgemäß zeigte die unsubstituierte Verbindung einen niedrigeren Verteilungskoeffizienten und eine höhere Wasserlöslichkeit. Auch die kinetische und thermodynamische Löslichkeit waren in diesem Fall am größten. Die thermodynamische Löslichkeit beider chlosubstituierten Verbindungen lag unterhalb der festgelegten Bestimmungsgrenze von 5 µM. Interessanterweise wies erneut die 8-Chlorverbindung eine höhere kinetische Löslichkeit als die 6-Chlorverbindung auf (vgl. Tabelle 5-4). Ein Vergleich zwischen den unterschiedlichen basischen Seitenketten von **26b** und **26f** zeigt zudem auf, dass der Piperidin-Rest im Vergleich zum *N*-Benzylmethylamin-Rest einen positiven Einfluss auf die kinetische und thermodynamische Löslichkeit hat. Die Löslichkeitsvorhersage nach Silicos-IT ^[143] ergab für alle Benzylmethylanderivate eine Löslichkeit im submikromolaren Bereich. Die Vorhersage nach YALKOWSKY ^[140] ergab ebenfalls die höchste Löslichkeit für Verbindung **27f**.

Aufgrund der großen Unterschiede zwischen den Hydrochloriden und den freien Basen wurden zwei Beispiele untersucht, bei denen sowohl das Hydrochlorid als auch die freie Base vermessen wurden. Als Beispiele dienten der Arzneistoff Ondansetron und Verbindung **27f** (Tabelle 5-7). Durch Deprotonierung und Extraktion wurde aus Ondansetron-Hydrochlorid die freie Base erhalten. Verbindung **27f** wurde für die zusätzlichen Versuche in das Hydrochlorid umgewandelt und ebenfalls untersucht. Erwartet wurde, dass die entsprechenden Hydrochloride im Vergleich zu den freien Basen eine sehr hohe thermodynamische Löslichkeit erzielen würden. Die größte kinetische und thermodynamische Löslichkeit wurde für das Arzneistoffbeispiel **42** · HCl · Dihydrat erwartet.

Tabelle 5-7: Vergleich der physikochemischen Eigenschaften zwischen den freien Basen und den Hydrochloriden der Verbindungen **27f** und **42** (Dihydrat).

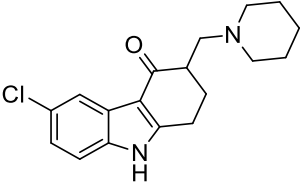
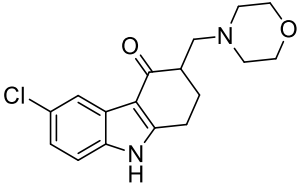
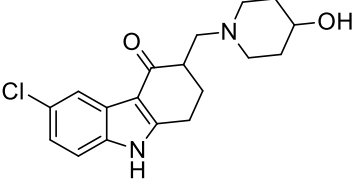
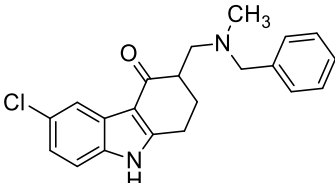
	clogP^a	S_y [μM]^b	cS [μM]^b	S_{exp., therm., pH 7.4} [μM]^c	S_{exp., kin., pH 7.4} [μM]^d
 <p>27f</p>	3.44	55.0	83.1·10 ⁻³	24.2 (21.7–26.6)	131 (130–132)
 <p>27f · HCl</p>	-0.40	166·10 ³	83.1·10 ⁻³	31.7·10 ³ (28810–34639)	429 (404–453)
 <p>42</p>	2.02	282	11.7	121 (110–131)	82.0 (69.5–94.4)
 <p>42 · HCl · 2 H₂O</p>	0.73	17.0·10 ³	11.7	25.0·10 ³ (24518–25578)	173 (132–213)

a) Berechneter Verteilungskoeffizient mit Marvin Sketch ^[142], b) Vorhergesagte Löslichkeit nach YALKOWSKY ^[140] und SwissADME (Silicos-IT) ^[143], c) Experimentell bestimmte thermodynamische Löslichkeit bei 254 nm, d) Experimentell bestimmte kinetische Löslichkeit. Mittelwert aus zwei Messungen, Spannweite in Klammern.

Für beide Paare konnte eine höhere kinetische und thermodynamische Löslichkeit für das Hydrochlorid im Vergleich zur entsprechenden freien Base festgestellt werden. Die thermodynamischen Löslichkeiten unterschieden sich bei den Hydrochloriden im Vergleich zu den freien Basen jedoch drastisch von den kinetischen Löslichkeiten. Während die kinetische Löslichkeit der Verbindung **27f** um etwa Faktor fünf größer als die thermodynamische Löslichkeit war, zeigte sich für das Hydrochlorid **27f** · HCl eine etwa 50fach höhere thermodynamische Löslichkeit. Bei **42** waren die kinetische und thermodynamische Löslichkeit wie bei der freien Base **27f** ähnlich, wobei die thermodynamische Löslichkeit ein wenig höher lag (Faktor ~1.5). Für das Hydrochlorid **42** · HCl · Dihydrat zeigte sich wiederum eine deutlich höhere thermodynamische Löslichkeit (Faktor ~150). Da für die Bestimmung der thermodynamischen Löslichkeit der Hydrochloride zur Herstellung eines Bodensatzes eine deutlich größere Menge im Vergleich zu den freien Basen verwendet wurde, zeigte sich dieser Einfluss auf die thermodynamische Löslichkeit in beiden Fällen. Das Hydrochlorid zeigte jeweils eine höhere kinetische Löslichkeit als die korrespondierende Base. Der Verteilungskoeffizient und die vorhergesagte Löslichkeit verhielten sich analog zu den bereits diskutierten Beispielen.

Um den Einfluss der basischen Seitenkette genauer zu untersuchen, wurden vier Verbindungen der Klasse **26** als freie Base miteinander verglichen. Die Vertreter der Verbindungsklasse **26** tragen an der cyclischen Grundstruktur einen Chlor-Substituenten in 6-Position. Diese Substanzen erwiesen sich als jeweils schlechter löslich als ihre 8-Chlor-Analoga und wurden deshalb für den Vergleich ausgewählt. Als Aminkomponenten sollten **b** (Piperidin), **c** (Morpholin), **e** (4-Hydroxypiperidin) und **f** (Benzylmethylamin) miteinander verglichen werden (Tabelle 5-8).

Tabelle 5-8: Vergleich des Einflusses unterschiedlicher basischer Seitenketten bei Verbindungen der Klasse **26** auf die physikochemischen Eigenschaften.

	clogP ^a	S _y [μM] ^b	cS [μM] ^b	S _{exp., therm., pH 7.4} [μM] ^d	S _{exp., kin., pH 7.4} [μM] ^e
 <p>26b</p>	2.89	83.2	1.66	178 (158–197)	83.2 (75.8–90.6)
 <p>26d</p>	1.83	562	5.75	7.24 (5.70–8.77)	512 (508–515)
 <p>26e</p>	1.42	6.92·10 ³	11.0	48.9 (43.2–54.5)	1.06·10 ³ (1060–1060)
 <p>26f</p>	3.94	9.12	0.0213	< 5	15.3 (11.8–18.7)

a) Berechneter Verteilungskoeffizient mit Marvin Sketch ^[142], b) Vorhergesagte Löslichkeit nach YALKOWSKY ^[140] und SwissADME (Silicos-IT) ^[143], c) Experimentell bestimmte thermodynamische Löslichkeit bei 254 nm, d) Experimentell bestimmte kinetische Löslichkeit. Mittelwert aus zwei Messungen, Spannweite in Klammern.

Während der Untersuchung der thermodynamischen Löslichkeit dieser Reihe erwies sich ein *N*-Benzylmethyl-Substituent am unvorteilhaftesten. Mit einer thermodynamischen Löslichkeit von 7.24 μM folgte die Verbindung mit Morpholin-Substituent. Bereits innerhalb des moderaten Bereichs konnte die Verbindung **26e** mit einem 4-Hydroxypiperidin-Substituenten eingeordnet werden. Die höchste thermodynamische Löslichkeit dieser Reihe zeigte die Verbindung **26b** mit Piperidin-Substituent. Hier lag die thermodynamische Löslichkeit nahe an dem geforderten Wert von 200 μM .

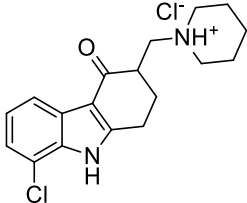
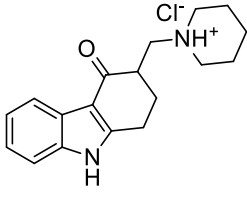
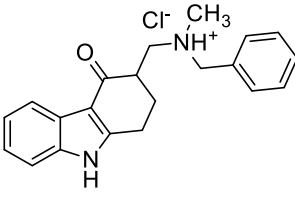
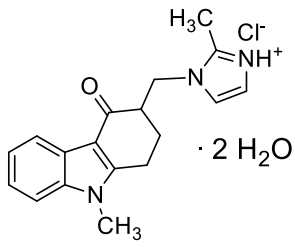
Bei der kinetischen Löslichkeit erzielte Verbindung **26f** in dieser Reihe ebenfalls den niedrigsten Wert. Auch **26e** zeigte erneut eine höhere Löslichkeit als **26d**. Verbindung **26b** wies jedoch eine geringere kinetische Löslichkeit auf als die Verbindungen mit Morpholin- oder 4-Hydroxypiperidin-Substituent. Die höchste kinetische Löslichkeit mit 1.06 mM zeigte die Verbindung **26e**, gefolgt von Verbindung **26d** mit 512 μM .

Der Zusammenhang zwischen der kinetischen Löslichkeit und der Struktur der basischen Seitenkette soll im Folgenden diskutiert werden. 4-Hydroxypiperidin weist einen weiteren Wasserstoffbrückendonator auf, sodass eine bessere Hydratisierbarkeit gegeben ist. Das Morpholin-Analogon hat im Vergleich zum Piperidin-Analogon eine zusätzliche Sauerstoffgruppierung, die als Wasserstoffbrückenakzeptor fungieren kann. Die niedrigste kinetische und thermodynamische Löslichkeit dieser Reihe lieferte das *N*-Benzylmethyl-Analogon, welches durch den aromatischen Benzyl-Rest charakterisiert ist. Daher empfiehlt sich die Verwendung eines Piperidin- oder 4-Hydroxypiperidin-Restes zur Verbesserung der kinetischen und thermodynamischen Löslichkeit. Ein Morpholin-Rest zeigte zwar eine hohe kinetische Löslichkeit, in thermodynamischen Experimenten hingegen konnte lediglich ein geringer Wert gemessen werden. Diese Messreihe zeigt außerdem auf, dass ein direkter Vergleich beider Löslichkeiten nicht unmittelbar möglich ist. In allen Fällen war die kinetische Löslichkeit ähnlich groß oder deutlich höher, was durch den 2.5%igen Zusatz des Lösungsvermittlers DMSO begründet ist.

Besonders auffällig war in dieser Reihe die hohe Übereinstimmung der nach YALKOWSKY^[140] vorausberechneten Löslichkeitswerte mit den experimentell bestimmten Werten der kinetischen Löslichkeiten. Dabei stimmte nicht nur die Tendenz innerhalb der Reihe. Auch die Abweichungen zwischen vorhergesagten und experimentellen Werten lagen unterhalb einer Größenordnung. Nach dieser Beobachtung scheint sich die Vorhersage nach YALKOWSKY^[140] gut für nichtionische Verbindungen zu eignen, die Schmelzpunkte zwischen 120 und 220 °C und clogP-Werte zwischen 1.4 und 4.0 aufweisen.

In Tabelle 5-9 sind alle untersuchten Hydrochloride dieser Arbeit hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften zusammengestellt.

Tabelle 5-9: Vergleich der physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Hydrochloride.

	clogP^a	S_y [μM]^b	cS [μM]^b	S_{exp., therm., pH 7.4} [μM]^d	S_{exp., kin., pH 7.4} [μM]^e
 <p>22b · HCl</p>	-0.93	331 · 10 ³	1.66	13.9 · 10 ³ (11746–16130)	2.34 · 10 ³
 <p>27b · HCl</p>	-1.45	1.00 · 10 ⁶	6.61	19.9 · 10 ³ (19197–20545)	>2.50 · 10 ³
 <p>27f · HCl</p>	-0.40	166 · 10 ³	83.1 · 10 ⁻³	31.7 · 10 ³ (28810–34639)	429 (404–453)
 <p>42 · HCl · 2 H₂O</p>	0.73	17.0 · 10 ³	11.7	25.0 · 10 ³ (24518–25578)	173 (132–213)

a) Berechneter Verteilungskoeffizient mit Marvin Sketch ^[142], b) Vorhergesagte Löslichkeit nach YALKOWSKY ^[140] und SwissADME (Silicos-IT) ^[143], c) Experimentell bestimmte thermodynamische Löslichkeit bei 254 nm, d) Experimentell bestimmte kinetische Löslichkeit. Mittelwert aus zwei Messungen, Spannweite in Klammern.

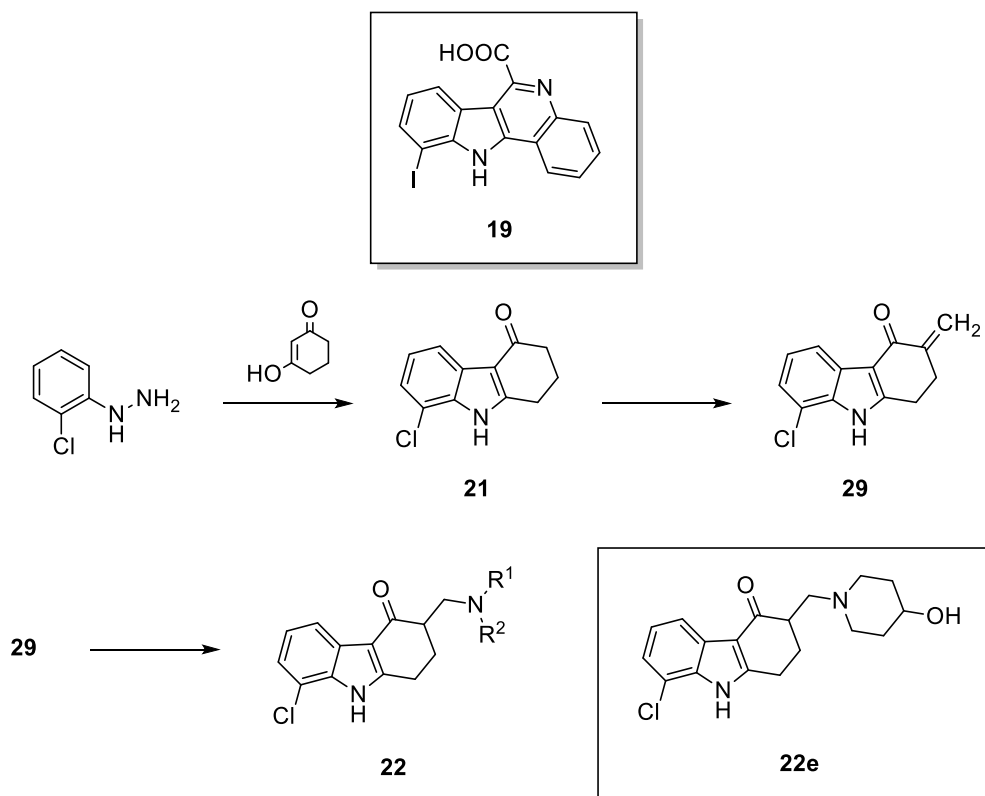
Alle bestimmten thermodynamischen Löslichkeiten dieser Reihe waren zufriedenstellend und lagen weit über dem geforderten Wert von 200 μM . Die kinetische Löslichkeit kam ebenfalls nah an diesen Wert heran oder überschritt ihn weit. Die beiden untersuchten Piperidin-Hydrochloride zeigten neben einer hohen thermodynamischen Löslichkeit auch sehr hohe kinetische Löslichkeiten ($> 2 \text{ mM}$). Die exakte Bestimmung der entsprechenden Werte mit Hilfe des beschriebenen nephelometrischen Verfahrens ist bei so hohen Löslichkeit schwierig, da für die Experimente hochkonzentrierte DMSO-Stammlösungen hergestellt werden müssen, um überhaupt eine Präzipitation unter den verwendeten Messbedingungen zu induzieren. Dazu wurde bei **22b** · HCl nur eine Einzelbestimmung durchgeführt und bei **27b** · HCl nur ein unterer Grenzwert (2.5 mM) angegeben. Die höchsten kinetischen und thermodynamischen Löslichkeiten dieser Arbeit wurden von den untersuchten Hydrochloriden erhalten. Die Hydrochloride der tertiären Amine **22b** · HCl, **27b** · HCl und **27f** · HCl zeigten alle eine höhere kinetische Löslichkeit als das entsprechende Imidazol-Derivat **22b** · HCl · Dihydrat.

Viele der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen zeigten eine moderate Löslichkeit über 30 μM und somit eine deutliche Verbesserung im Vergleich zu den untersuchten Verbindungen **19** und **20**. Vor allem die Hydrochloride zeigten eine Löslichkeit oberhalb der gewünschten Grenze von 200 μM . Durch Einführung von basischen Seitenketten konnte die Löslichkeit der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen somit erhöht werden. Eine Umwandlung in das Hydrochlorid erwies sich dabei ebenfalls als vorteilhaft. Im Regelfall lag die kinetische Löslichkeit der Neutralsubstanzen höher als die thermodynamische Löslichkeit. Diese Beobachtung wird ebenfalls von SAAL und PETERIT^[129] beschrieben. Die Verwendung von DMSO zur Herstellung der Verdünnungsreihen spielt für dieses Phänomen eine wesentliche Rolle, da DMSO bereits in geringen Konzentrationen als Lösungsvermittler fungieren kann. Höhere thermodynamische als kinetische Löslichkeiten werden mit der Bildung von übersättigten Lösungen begründet.^[129] Die Polymorphie der untersuchten Verbindungen hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die Löslichkeit. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die freien Basen und Hydrochloride häufig als amorphe Feststoffe vermessen. Amorphe Feststoffe zeigten in Versuchen von SAAL und PETERIT^[129] höhere thermodynamische Löslichkeiten als kristalline. Übersättigte Lösungen entstanden überwiegend aus amorphen Feststoffen.^[129] Der Unterschied zwischen kinetischer und thermodynamischer Löslichkeit war bei amorphen Substanzen kleiner als bei kristallinen, was auch in den hier durchgeführten Untersuchungen festzustellen war (**42** · HCl · Dihydrat). HUANG *et al.*^[183] kamen zu dem Schluss, dass die *solid state*-Eigenschaften eine wesentliche Rolle bei der Bestimmung der Löslichkeit spielen.

6 Zusammenfassung

Die Überfunktion der Proteinkinase DYRK1A wird als Ursache verschiedener neurodegenerativer Störungen diskutiert. Hemmstoffe dieses Enzyms kommen deshalb als potentielle Therapeutika in Frage, beispielsweise zur Behandlung der Alzheimer-Demenz oder des Down-Syndroms. Bei der Entwicklung selektiver DYRK1A-Hemmstoffe ist die strukturelle Ähnlichkeit verwandter Kinasen aus der DYRK- und der CLK-Familie ein Problem, weshalb viele der publizierten Inhibitoren nur mangelnde Selektivität aufweisen.

FALKE gelang es, mit der 10-Iod-11*H*-indolo-[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**19**) einen selektiven und potenten DYRK1A-Inhibitor zu entwickeln, der jedoch nur sehr niedrige Löslichkeit in wässrigen Medien aufwies.^[50] Die hier vorgelegte Arbeit zielte darauf ab, ausgehend von Struktur **19** besser wasserlösliche DYRK1A-Inhibitoren zu entwerfen, zu synthetisieren und für die biologische Testung zur Verfügung zu stellen. Dazu wurde formal das Chinolincarbonsäure-Element am 8-Halogenindol-Grundkörper durch einen Cyclohexanon-Anellanden ersetzt. Zudem wurde eine Aminomethyl-Seitenkette in Nachbarschaft der Carbonylgruppe angefügt, so dass Mannich-Basen des Typs **22** resultierten.



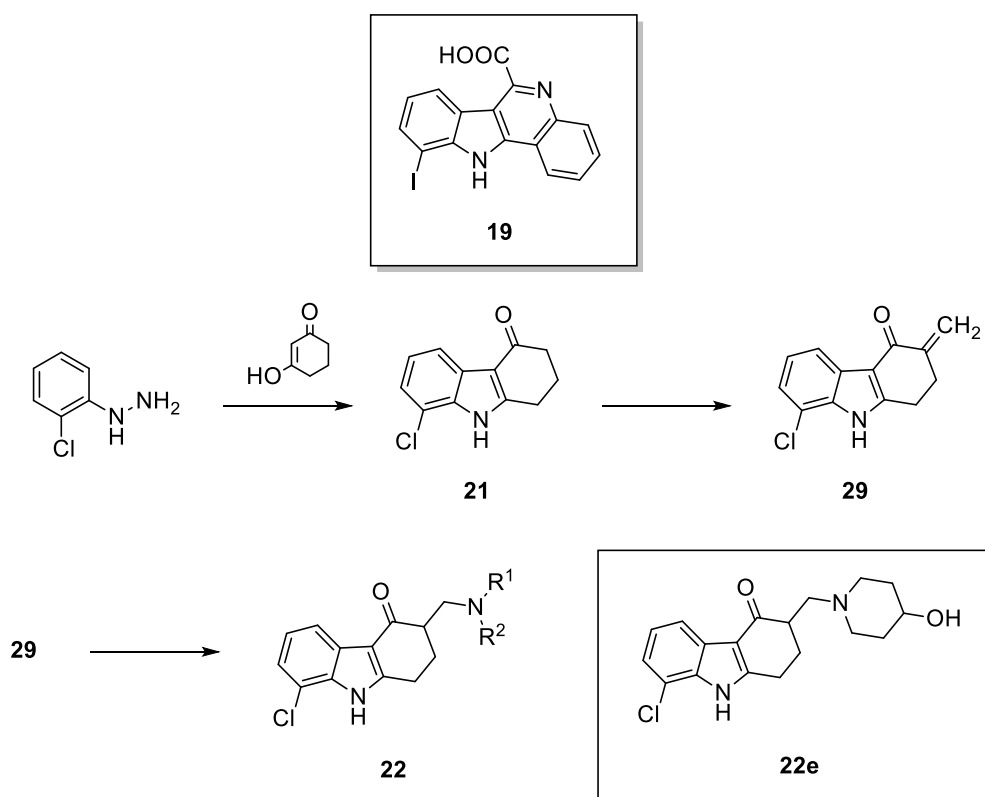
Diverse Vertreter der Substanzklasse **22** wurden in *molecular modelling*-Studien in die ATP-Bindetasche der DYRK1A gedockt. Als Grundlage dienten dazu publizierte Röntgenstrukturen der Kinase aus der öffentlich zugänglichen RSCB *protein data bank*. Dabei ergaben meistens beide Enantiomere sinnvolle *docking*-Posen, die gute inhibitorische Aktivitäten erwarten ließen.

Die Synthese der so entworfenen potentiellen Inhibitoren **22** stellte sich jedoch als unerwartet herausfordernd dar. Bei der Herstellung des Grundkörpers **21** durch eine Indol-Synthese nach FISCHER führte der Halogensubstituent in ortho-Position zur Anellierungsstelle zunächst zu sehr schlechten Ausbeuten, weshalb die Reaktionsbedingungen modifiziert werden mussten. Anschließend ließ sich die Zwischenstufe **21** nicht wie geplant direkt in einer Drei-Komponenten-Reaktion nach Mannich zu den Zielverbindungen der Klasse **22** umsetzen. Daher wurde zunächst die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung **29** synthetisiert, die schließlich mit sekundären Aminen zu den gewünschten Endstufen **22** umgesetzt werden konnten. Diese erwiesen sich sowohl als freie Basen oder in der Form der Aminium-Hydrochloride als deutlich besser löslich in wässrigen Medien als die Grundstruktur **19**. Mit Ausnahme der Mannich-Base **22e**, die eine schwache Inhibition der Proteinkinasen CLK1 und CLK4 bewirkte, waren alle anderen Vertreter der Substanzklasse **22** an DYRK1A und den untersuchten verwandten Proteinkinasen inaktiv. Stattdessen zeigte jedoch das Intermediat **29** eine deutliche DYRK1A-Inhibition im mikromolaren Konzentrationsbereich bei wesentlich verbesserter Löslichkeit im Vergleich zur Leitverbindung **19**, die ihrerseits allerdings ein weitaus stärkerer Kinaseinhibitor ist. Am Beispiel von Verbindung **29** konnte die wichtige Rolle des 8-Halogensubstituenten für die Hemmung der DYRK1A demonstriert werden, denn Analoga von **29** mit fehlendem oder formal in 6-Position verschobenem Chlor-Substituenten zeigten an DYRK1A oder verwandten Kinasen keine inhibitorische Aktivität.

7 Summary

The hyperactivity of the protein kinase DYRK1A is discussed as a cause of various neurodegenerative disorders. Inhibitors of this enzyme are therefore potential therapeutics, for example for the treatment of Alzheimer's disease or Downs syndrome. For the development of selective DYRK1A inhibitors, the structural similarity of related kinases of the DYRK and CLK families is a problem, which is why many of the published inhibitors show only insufficient selectivity.

FALKE succeeded in developing a selective and potent DYRK1A inhibitor with the 10-Iodo-11*H*-indolo-[3,2-*c*]quinoline-6-carboxylic acid (**19**), which, however, showed only very low solubility in aqueous media.^[50] The aim of the work presented here was to design and synthesize DYRK1A inhibitors with better water solubility based on structure **19** and making them available for biological testing. For this purpose, the quinolinecarboxylic acid element attached to the 8-halogenindole basic scaffold was formally replaced by a cyclohexanone annelated. In addition, an aminomethyl side chain was added adjacent to the carbonyl group, resulting in Mannich bases of type **22**.



Various representatives of substance class **22** were docked into the ATP binding pocket of DYRK1A in molecular modelling studies. These studies were based on published X-ray structures of the kinase from the open accessible RSCB protein data bank. In most cases, both enantiomers resulted in meaningful docking poses that indicated good inhibitory activity.

The synthesis of the potential inhibitors designed in this way turned out to be unexpectedly challenging. During the production of the basic tetrahydrocarbazolone scaffold **21** by Fischer indole synthesis, the halogen substituent in ortho-position to the annelation site initially led to very poor yields, which is why the reaction conditions had to be broadly modified. In the following process step, intermediate stage **21** could not be converted as planned directly to the class **22** target compounds in a Mannich three-component reaction. Therefore, the α,β -unsaturated carbonyl compound **29** was synthesized first, which could then be converted with secondary amines to the desired final structures **22**. These proved to be much more soluble in aqueous media than the basic structure **19**, either as free bases or in the form of aminium hydrochlorides. With the exception of Mannich base **22e**, which caused weak inhibition of the protein kinases CLK1 and CLK4, all other representatives of substance class **22** were inactive on DYRK1A and the related protein kinases investigated. Instead, intermediate **29** showed DYRK1A inhibition in a micromolar concentration range with significantly improved solubility compared to lead compound **19**, which in turn is a much stronger kinase inhibitor. The example of compound **29** demonstrates the important role of the 8-halogen substituent for the inhibition of DYRK1A, because analogues of **29** with missing or formally shifted chlorine substituent in 6-position showed no inhibitory activity on DYRK1A or related kinases.

8 Experimenteller Teil

8.1 Geräte und Methoden

Chemikalien und Ausgangsstoffe

1,2,3,4-Tetrahydrocarbazol-4-on (**33**) wurde von TCI (Tokyo Chemical Industry Co., Tokio, Japan) erworben. Zusätzliche Ausgangsstoffe wurden bei Acros Organics (Geel, Belgien), Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Nach NMR-spektroskopischer Untersuchung wurden die entsprechenden Ausgangsstoffe ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurden Lösungsmittel mit Synthesequalität verwendet. *N,N*-Dimethylformamid wurde in der erhältlichen Uvasol-Qualität verwendet.

Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigfolien Polygram® SIL G/UV₂₅₄, Silicagel 60 (0.20 mm) auf Polyester, 40 x 80 mm, Fluoreszenzindikator, Fa. Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Die Auswertung erfolgte in einem UV-Kabinett (254 und 366 nm, UV Cabinet, Fa. CAMAG, Muttenz, Schweiz). Zur Entwicklung wurden Fließmittelgemische aus Petrolether/Ethylacetat in verschiedenen Zusammensetzungen und für die Mannich-Basen Dichlormethan/Toluen/Ammoniak (aq., 25%) verwendet.

Elementaranalyse

CE Instruments Flash EA 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest (San Jose, CA, USA). Die berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte wurden in der Regel durch Bildung des Mittelwertes aus einer Doppel- oder Dreifachbestimmung ermittelt und in Prozent angegeben.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), analytisch

System 1: Merck Hitachi Elite LaChrom: *diode array detector* (DAD) L-2450, Pumpe L-2130, Autosampler L-2200, Säulenofen L-2300 (Ofentemperatur: 40 °C), Organizerbox L-2200; Software: EZChrom Elite, Version 3.3.2 SP2, Fa. Hitachi High-Technologies Corporation (Tokio, Japan).

System 2: VWR Hitachi Chromaster: DAD 5430, Pumpe 5110, Autosampler 5260, Säulenofen 5310 (Ofentemperatur: 40 °C): Software: Chromaster System Manager Version 1.1, Fa. Hitachi High-Technologies Corporation (Tokio, Japan).

System 3: Merck Hitachi Elite LaChrom: UV-Detektor L-2400, Pumpe L-2130, Autosampler L-2200, Organizerbox L-2200; Software: EZChrom Elite, Version 3.3.2 SP2, Fa. Hitachi High-Technologies Corporation (Tokio, Japan).

Stationäre Phase: LiChroCART 125-4, LiChrospher 100 RP-18 (5 µm), Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland).

Probenvorbereitung: Etwa 0.5–1 mg der entsprechenden Verbindung wurden in 300 oder 400 µL DMSO (HPLC-Qualität) in Whatman Mini-UniPrep Vials (~0.4 mL) gelöst und mittels des integrierten Filters direkt im Vial filtriert.

Elutionsmittel: Isokratische Elution: Acetonitril/Wasser- oder Acetonitril/Puffer-Gemische in unterschiedlichen Zusammensetzungen. Triethylaminpuffer pH 2.7: Triethylamin (20 mL) und Natriumhydroxid (242 mg) wurden in Wasser (bidest., 980 mL) gelöst und mit konz. H₂SO₄ auf pH 2.4–2.7 eingestellt; Gradientenelution: Acetonitril-Wasser-Verhältnis (0–2 min: 10% ACN; 2–12 min: 10% → 90% ACN (linearer Anstieg über die Zeit); 12–20 min: 90% ACN).

Elution: Die Injektionsvolumina wurden der eingesetzten Menge angepasst (i. d. R. 5–20 µL), sodass die maximale Absorption zwischen 300 und 1500 mAU lag; Flussrate: 1.0 mL/min; Laufzeit: 10–60 min (isokratische Elution) bzw. 20 min (Gradientenelution).

Detektion und Auswertung: Isokratische und Gradientenelution: Erfassung des UV-Spektrums zwischen 200 und 400 nm mittels DAD. Die Auswertung erfolgte bei 254 nm und 280 nm. Aus dem UV-Spektrum wurden die Absorptionsmaxima (λ_{max}) abgelesen und bei den analytischen Daten angegeben. Die Quantifizierung erfolgte mit der 100%-Methode nach Integration der Peakflächen (AUC 100%); Integrationsausschluss 0–1.6 min; *threshold*: 1000 (System 1,3), *sensitivity*: 50 (System 2); Angabe der Totzeit (t_m , in Bezug auf den DMSO-Peak) und der Bruttoretentionszeit (t_{ms}).

Infrarotspektrometrie

Nicolet FT-IR 200 Spektrometer, Fa. Thermo Nicolet (Madison, WI, USA). Alle synthetisierten Verbindungen wurden in Feststoffform als KBr-Presslinge vermessen.

Kernspinresonanzspektroskopie

Die Bereitstellung der NMR-Spektren erfolgte durch das NMR-Labor des Instituts für Organische Chemie der TU Braunschweig.

Bruker Avance III 400 (^1H -NMR-Messung: 400 MHz; ^{13}C -NMR-Messung: 101 MHz), Bruker Avance IIIHD 500 (^1H -NMR-Messung: 500 MHz; ^{13}C -NMR-Messung: 126 MHz), Bruker Avance II 600 (^1H -NMR-Messung: 600 MHz; ^{13}C -NMR-Messung: 150 MHz), Fa. Bruker (Rheinstetten, Deutschland).

Lösungsmittel: $\text{DMSO}-d_6$.

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS); Die chemischen Verschiebungen wurde in Bezug zu TMS ($\delta_{\text{TMS}} = 0$ ppm) in ppm angegeben.

^1H -NMR: Das Protonenverhältnis wurde durch Integration ermittelt. Signalmultiplizität: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multiplett, dd = Dublett von Dubletts.

^{13}C -NMR: Aufnahme von breitbandenkoppelten Spektren. Die individuelle Zuordnung der Kohlenstoff-Signale erfolgte durch ^{13}C -DEPT135-Experimente.

Massenspektrometrie

Die Aufnahme der EI-Spektren und von hochaufgelösten Spektren (HRMS-Spektren) wurde am Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt. Geräte: EI (niedrige Auflösung), Thermo Finnigan MAT95XL (Bremen, Deutschland), Auflösung 2000, Scans 40–1000 amu, *source temp.* 180 °C, Ionisationsenergie 70 eV. HR-EIMS, Thermo Finnigan MAT95XL (Bremen, Deutschland), Auflösung 10000, interner Massenstandard Perfluorkerosin (PFK), *Source Temp.* 180 °C, Ionisationsenergie 70 eV. ESI-HRMS, LTQ-Orbitrap Velos ThermoFisher Scientific (Bremen, Deutschland), Auflösung 100000 FWHM (*full width at half maximum height*) bei ($m/z = 400$ amu), Scans 130–2000 amu, interner Massenstandard Tetradecyltrimethylammoniumbromid, Lösungsmittel: Methanol, Konzentration etwa 50 µg/mL, Flussrate: 1 µL/min, *sprayvoltage: pos. mode* 2.3–2.8 kV, *neg. mode*: 1.7–2.5 kV. Angegeben wurden die Peaks der Molekülkationen $[M]^{*+}$ (EI) oder $[M+H]^+$ (ESI) und charakteristische Peaks. Die berechneten und gefundenen Massenzahlen wurden ebenfalls angegeben.

Benchtop-MS: expression^L CMS-Spektrometer, Fa. Advion (Ithaca, NY, USA). Die APCI-Messung erfolgte im positiven und negativen Modus durch direkte Probenzufuhr mit einer ASAP-Sonde (*atmospheric solids analysis probe*) oder durch Ausstanzung aus einer Dünnschichtchromatographie-Platte. Einstellungen: *source gas temperature*: 350 °C, APCI *corona discharge*: 5.0 µA, *capillary temperature*: 250 °C, *capillary voltage*: 170 V; Die ESI-Messung erfolgte im positiven Modus durch Direkteinspritzung. Lösung in Ethylacetat oder Tetrahydrofuran und Zusatz von etwa 50 µL Eisessig. Einstellungen: *source gas temperature*: 250 °C, *capillary temperature*: 250 °C, *capillary voltage*: 180 V, *ESI⁺ voltage*: 3500 V, *ESI⁻ voltage*: 2500 V. Software: Advion Mass Express (Spektrenaufnahme) und Advion Data Express (Auswertungssoftware, Version 3.1.21.1).

Nephelometer

NEPHELOStar^{Plus}, Fa. BMG LABTECH (Ortenberg, Deutschland).

pH-Meter

632 pH-Meter mit Glaselektrode, Fa. Metrohm (Filderstadt, Deutschland).

Schmelzpunktbestimmung

Digitales Schmelzpunktbestimmungsgerät Electrothermal IA 9200, Fa. Cole-Palmer (Stone, Vereinigtes Königreich). Die Bestimmung des Schmelzpunktes (Schmp.) erfolgte in einseitig geschlossenen Glaskapillaren im Rahmen einer Doppelbestimmung. Eine Zersetzung (Zers.) wurde entsprechend gekennzeichnet.

Schüttelinkubator

IKA KS 3000 ic control mit Kühler (separat) KV 600 digital – 230 V, Fa. IKA-Werke (Staufen, Deutschland).

Waagen

Analysenwaage Sartorius ENTRIS224I-1S, Fa. Sartorius (Göttingen, Deutschland).
Laborwaage Sartorius 1264 MP, Fa. Sartorius (Göttingen, Deutschland).

8.2 Synthese und analytische Daten

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) 1: Synthese der 3- Methylen-Verbindungen **29-31**

Das entsprechende 1,2,3,9-Tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**21**, **28** oder **33**, 1 Äquivalent) wird im angegebenen Volumen DMF gelöst. Nach Zusatz von *N,N*-Dimethylmethyleniminiumchlorid (**41**, 1.2 Äquivalente) wird der Reaktionsansatz für die angegebene Zeit bei 130 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird dem Reaktionsansatz Wasser (25 mL) zugesetzt. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt und ohne weitere Aufarbeitung in reiner Form erhalten.

AAV 2: Synthese der Mannich-Basen der Klassen **22**, **26** und **27** (Methode A)

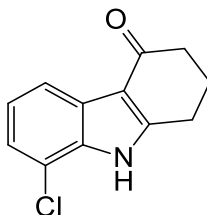
Die Synthese der entsprechenden Mannich-Basen erfolgte in Anlehnung an die Dissertation von JENNING.^[166] Das entsprechende 3-Methylen-carbazol-4-on (**29-31**, 1 Äquivalent) wird in einem Gemisch aus 1,4-Dioxan und Wasser (1:1) suspendiert. Anschließend wird die Aminkomponente (3 Äquivalente) zugesetzt und bei den angegebenen Reaktionsbedingungen gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wird dem Reaktionsansatz Ethylacetat (30 mL) zugesetzt und dreimal mit Schwefelsäure (5% V/V, 20 mL) extrahiert. Die vereinten schwefelsauren Phasen werden mit 5 M NaOH-Lsg. alkalisiert (Lackmus-Färbung: tiefblau). Nach zweimaliger Extraktion mit Ethylacetat (50 mL) werden die vereinten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lsg. (50 mL) gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Einengen am Rotationsverdampfer wird die entsprechende freie Base erhalten.

AAV 3: Synthese der Mannich-Basen der Klassen **22**, **26** und **27** (Methode B)

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine publizierte Methode von COATES *et. al.*^[167]. Das entsprechende 3-Methylen-carbazol-4-on (**29-31**, 1 Äquivalent) wird in Wasser (5 mL) suspendiert. Im Anschluss wird die Aminkomponente (2 Äquivalente) zugesetzt und der Reaktionsansatz für 48 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der ausgefallene Feststoff abgesaugt und aus Methanol umkristallisiert.

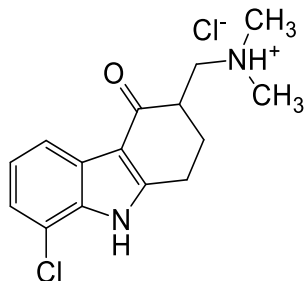
AAV 4: Fällung der Mannich-Basen der Klassen **22**, **26** und **27** als Hydrochloride

Für die Fällung als Hydrochlorid wird die entsprechende Mannich-Base in Isopropylalkohol (1–5 mL) gelöst und mit einer äquimolaren Menge isopropanolischer Chlorwasserstofflösung (5–6 M) tropfenweise versetzt. Sollte kein Niederschlag entstanden sein, wird der Lösung bis zur Präzipitation tropfenweise Diethylether zugesetzt. Anschließend wird der entstandene Niederschlag abgesaugt und getrocknet.

8-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-on (21)

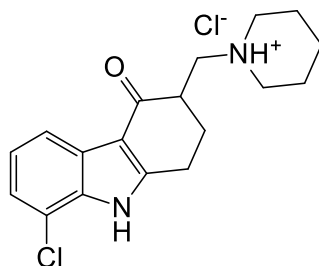
1,3-Cyclohexandion (**37**, 3.10 g, 27.9 mmol) wurde in Wasser (25 mL) gegeben und anschließend portionsweise mit 2-Chlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (**35**, 5.00 g, 27.7 mmol) in Wasser (25 mL) versetzt und für 168 h bei Raumtemperatur gerührt. Das entstandene Phenylhydrazon wurde abgesaugt und getrocknet. Im Anschluss wurde das Phenylhydrazon für 2 h bei 150 °C in wässriger H₂SO₄ (100 mL, 40 % V/V) gerührt. Der Ansatz wurde heiß abgesaugt und Wasser (150 mL) dem Filtrat zugesetzt. Nach 12 h im Kühlschrank wurde der ausgefallene Niederschlag abgesaugt und für 2 h bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet. Danach wurde der erhaltene Feststoff in Ethylacetat (150 mL) aufgekocht und erneut heiß abgesaugt. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und der erhaltene Feststoff aus Ethanol (70%, V/V) umkristallisiert. Es wurden 1.25 g (21%) eines dunklen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 258–259 °C (Lit. ^[145] : 266–267); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.07–2.19 (m, 2H), 2.45 (dd, *J* = 7.2, 5.6 Hz, 2H), 3.00 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.11–7.20 (m, 1H), 7.25 (dd, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 7.8, 0.9 Hz, 1H), 12.19 (s, 1H).; ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz): δ (ppm) = 22.7, 23.2, 37.7 (CH₂), 119.0, 122.0, 122.7 (CH), 112.5, 115.9, 126.4, 132.8, 153.5, 193.2 (C).

8-Chlor-3-[(dimethylamino)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on-Hydrochlorid (**22a** · HCl)

Nach AAV 2 aus 8-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**29**, 150 mg, 0.647 mmol) und Dimethylamin (250 μ L, 1.95 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 17 h bei 55 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Anschließend wurde die freie Base nach AAV 4 als Hydrochlorid gefällt. Nach anschließender Filtration wurden 31 mg (15%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

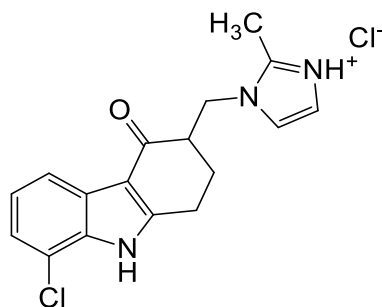
Schmp.: 202–203 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3398 cm^{-1} (NH), 2615 cm^{-1} (NH⁺), 1634 cm^{-1} (C=O), 1618 cm^{-1} (C=C), 1473 cm^{-1} ; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 1.95–2.05 (m, 1H), 2.30–2.37 (m, 1H), 2.85 (s, 3H, CH₃), 2.86 (s, 3H, CH₃) 3.08–3.20 (m, 4H), 3.59–3.67 (m, 1H), 7.20 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.30 (dd, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.88–7.93 (m, 1H, Ar-H), 9.55 (s, 1H, NH⁺), 12.43 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz): δ (ppm) = 42.6, 43.4 (CH₃) 22.1, 27.6, 57.5 (CH₂), 40.8, 118.7, 122.4, 123.1 (CH), 111.6, 116.1, 126.2, 133.2, 153.9, 193.2 (C); C₁₅H₁₈Cl₂N₂O (313.22); HR-ESIMS *m/z* (%) [M–Cl]⁺ ber. 277.11022, gef. 277.11051 (100); MS (ESI +) *m/z* (%) 371 [M–HCl+95(unspez.)]⁺ (30), 277 [M–Cl]⁺ (100), 145 [M–HCl–131]⁺ (20), 58 [M–C₁₂H₉CINO–Cl]⁺ (64), MS (ESI –) *m/z* (%) 275 [M–Cl[–]–2H⁺][–] (100); HPLC (isokr.): 99.3% bei 254 nm, 99.4% bei 280 nm, *t*_{ms} = 4.7 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 20:80) (System 1); λ_{\max} 245 nm, 266 nm, 303 nm.

8-Chlor-3-(piperidin-1-ylmethyl)-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on-Hydrochlorid (**22b** · HCl)

Nach AAV 2 aus 8-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**29**, 150 mg, 0.647 mmol) und Piperidin (195 μ L, 1.95 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 16 h bei 55 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Anschließend wurde die freie Base nach AAV 4 als Hydrochlorid gefällt. Nach anschließender Filtration wurden 130 mg (57%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

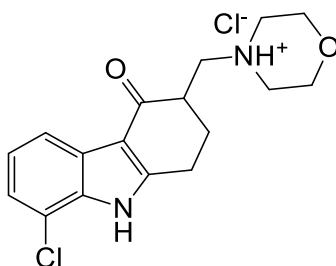
Schmp.: 215–216 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ 3420 cm^{-1} (NH), 2619 cm^{-1} , 2515 cm^{-1} (NH⁺), 1618 cm^{-1} (C=O), 1572 cm^{-1} (C=C), 1471 cm^{-1} ; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) = 1.35–1.49 (m, 1H), 1.60–1.89 (m, 5H), 1.97–2.11 (m, 1H), 2.38–2.47 (m, 1H), 2.90–3.22 (m, 6H), 3.46–3.65 (m, 3H), 7.19 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.29 (dd, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.92 (dd, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 9.48 (s, 1H, NH⁺), 12.39 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 126 MHz): δ (ppm) = 21.2, 22.0, 22.1, 22.2, 28.3, 52.5, 52.9, 56.5 (CH₂), 41.2, 118.8, 122.3, 123.0 (CH), 111.6, 116.1, 126.3, 133.1, 153.7, 192.5 (C); EA: C₁₈H₂₂Cl₂N₂O (353.29) ber. C 61.20, H 6.28, N 7.93, gef. C 60.94, H 6.34, N 7.74; MS (ESI +) *m/z* (%) 573 [M+221]⁺ (13), 555 [M+203]⁺ (15), 317 [M–Cl]⁺ (100), 98 [M–Cl–219]⁺ (73); HPLC (isokr.): 99.4% bei 254 nm, 99.3% bei 280 nm, *t*_{ms} = 3.3 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 30:70) (System 1); λ_{max} 245 nm, 266 nm, 302 nm.

8-Chlor-3-[(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on-Hydrochlorid (**22c** · HCl)



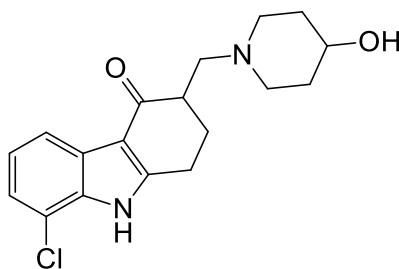
Nach AAV 2 aus 8-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**29**, 214 mg, 0.924 mmol) und 2-Methyl-1*H*-imidazol (250 mg, 3.01 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 2 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 20 h bei 100 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Anschließend wurde die freie Base nach AAV 4 als Hydrochlorid gefällt. Nach anschließender Filtration wurden 50.1 mg (16%) eines ockernen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 173–175 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ 3428 cm⁻¹ (NH), 2739 cm⁻¹ (NH⁺), 1635 cm⁻¹ (C=O), 1474 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) = 1.94–2.07 (m, 1H), 2.07–2.15 (m, 1H), 2.64 (s, 3H, CH₃), 3.00–3.21 (m, 3H), 4.27 (dd, *J* = 14.3, 7.4 Hz, 1H), 4.66 (dd, *J* = 14.3, 6.1 Hz, 1H), 7.18 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (dd, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.59 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.67 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.91 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 12.34 (s, 1H, NH⁺), 14.25 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 126 MHz): δ (ppm) = 10.5 (CH₃), 21.9, 26.5, 46.7 (CH₂), 45.7, 117.9, 118.8, 122.3 (2C), 123.0 (CH), 111.8, 116.0, 126.2, 133.1, 144.5, 153.4, 191.9 (C); C₁₇H₁₇Cl₂N₃O (350.24); HR-EIMS *m/z* (%) [M–HCl]⁺ ber. 313.09819, gef. 313.09764; EIMS *m/z* (%) 313 (2), 231 (58), 191 (22), 163 (26), 82 (100), 54 (36); MS (ESI +) *m/z* (%) 597 [M+248]⁺ (100), 565 [M+216]⁺ (44), 314 [M–Cl]⁺ (29), 83 [M–266][–] (18); HPLC (isokr.): 96.6% bei 254 nm, 95.4% bei 280 nm, *t*_{MS} = 6.5 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 20:80, 0–20 min, 30:70, 20–35 min) (System 1); λ_{max} 245 nm, 266 nm, 302 nm.

8-Chlor-3-(morpholinomethyl)-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on-Hydrochlorid (**22d** · HCl)

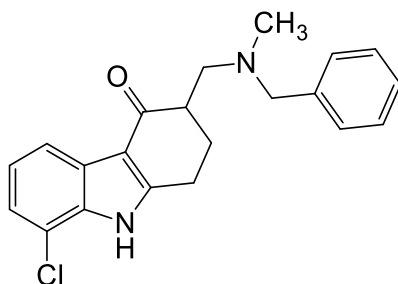
Nach AAV 2 aus 8-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**29**, 100 mg, 0.432 mmol) und Morpholin (115 μ L, 1.33 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 6 h bei 100 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Anschließend wurde die freie Base nach AAV 4 als Hydrochlorid gefällt. Nach anschließender Filtration wurden 88 mg (58%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 222–224 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3429 cm^{-1} (NH), 2458 cm^{-1} (NH⁺) 1613 cm^{-1} (C=O), 1467 cm^{-1} ; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) = 1.98–2.09 (m, 1H), 2.36–2.44 (m, 1H), 3.10–3.15 (m, 2H), 3.15–3.25 (m, 4H), 3.50–3.59 (m, 2H), 3.67–3.73 (m, 1H), 3.79–3.87 (m, 2H), 3.95–4.02 (m, 2H), 7.20 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.30 (dd, J = 7.8, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.88–7.95 (m, 1H, Ar-H), 9.88 (s, 1H, NH⁺), 12.39 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 126 MHz): δ (ppm) = 22.1, 28.0, 51.7 (2C), 56.8, 62.9, 63.0 (CH₂), 40.7, 118.8, 122.4, 123.1 (CH), 111.6, 116.1, 126.2, 133.1, 153.7, 192.4 (C); C₁₇H₂₀Cl₂N₂O₂ (355.26); HR-ESIMS m/z (%) [2M–2HCl+Na⁺]⁺ ber. 659.21623, gef. 659.21657, [M–HCl+Na⁺]⁺ ber. 341.10274, gef. 341.10254 (5), [M–Cl]⁺ ber. 319.12078, gef. 319.12115 (100), [M–Cl–Cl]⁺ ber. 285.15975, gef. 285.16009 (5); MS (ESI +) m/z (%) 319 [M–Cl]⁺ (22), 179 [M–Cl–140]⁺ (71), 100 [M–Cl–219]⁺ (100); HPLC (isokr.): 96.4% bei 254 nm, 95.3% bei 280 nm, t_{ms} = 5.2 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/Puffer 20:80) (System 1); λ_{max} 246 nm, 266 nm, 303 nm.

8-Chlor-3-[(4-hydroxypiperidin-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**22e**)

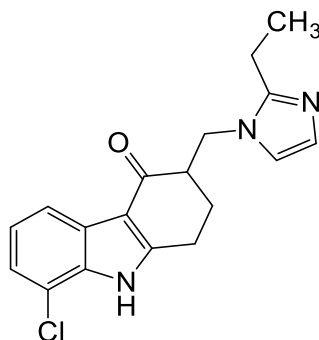
Nach AAV 3 aus 8-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**29**, 158 mg, 0.682 mmol) und 4-Hydroxypiperidin (138 mg, 1.36 mmol). Nachdem der Niederschlag abfiltriert und aus Methanol umkristallisiert wurde, wurden 57 mg (25%) eines dunkelgrünen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 125–127 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3450 cm^{-1} (NH), 3213 cm^{-1} (OH), 1620 cm^{-1} (C=O), 1573 cm^{-1} (C=C), 1474 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.31–1.50 (m, 2H), 1.59–1.81 (m, 2H), 1.84–2.02 (m, 2H), 2.04–2.19 (m, 1H), 2.23–2.37 (m, 1H), 2.37–2.48 (m, 1H), 2.55–2.71 (m, 3H), 2.74–2.85 (m, 1H), 2.87–3.12 (m, 2H), 3.43 (dt, $J = 9.6, 4.8$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 7.14 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, Ar-H), 7.24 (dd, $J = 7.7, 1.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.90 (dd, $J = 7.8, 1.0$ Hz, 1H, Ar-H), 12.16 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 21.3, 26.9, 34.4, 34.6, 50.3, 51.9, 57.1 (CH_2), 44.0, 66.4, 118.9, 121.9, 122.6 (CH), 112.1, 115.8, 126.5, 132.9, 153.1, 194.6 (C); $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (332.83); HR-EIMS m/z (%) [$\text{M}]^{+}$ ber. 332.12916, gef. 332.12861; EIMS m/z (%) 332 (2), 231 (100), 203 (27), 191 (41), 163 (47), 114 (39), 44 (29); MS (ESI +) m/z (%) 355 [$\text{M}+\text{Na}^+$] $^+$ (22), 333 [$\text{M}+\text{H}^+$] $^+$ (100), 114 [$\text{M}-\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClNO}$] $^+$ (82), MS (ESI –) m/z (%) 331 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ (100); HPLC (isokr.): 96.7% bei 254 nm, 95.4% bei 280 nm, $t_{\text{ms}} = 10.9$ min, $t_{\text{m}} = 1.1$ min (ACN/Puffer 30:70) (System 1); λ_{max} 244 nm, 266 nm, 304 nm.

3-([Benzyl(methyl)amino]methyl)-8-chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**22f**)

Nach AAV 2 aus 8-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**29**, 150 mg, 0.647 mmol) und *N*-Benzylmethylamin (265 μ L, 2.05 mmol) 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 2 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 16 h bei 55 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Nach Einengung am Rotationsverdampfer wurden 83 mg (36%) eines farblosen kristallinen Feststoffes erhalten.

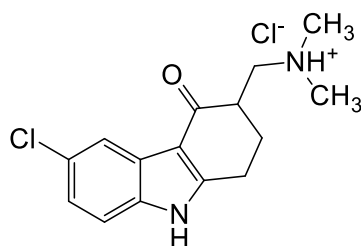
Schmp.: 161–162 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ 3410 cm^{-1} (NH), 1628 cm^{-1} (C=O), 1611 cm^{-1} (C=C), 1467 cm^{-1} (HN–C=C–C); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) = 1.93–2.03 (m, 1H), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.29–2.41 (m, 1H), 2.52–2.59 (m, 1H), 2.62–2.76 (m, 2H), 2.87–3.02 (m, 2H), 3.36–3.40 (m, 1H), 3.64 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 7.14 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.19–7.28 (m, 2H, Ar-H), 7.28–7.35 (m, 4H, Ar-H), 7.89 (dd, J = 7.8, 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 12.15 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ (ppm) = 44.29 (CH₃), 21.0, 26.5, 56.1, 61.7 (CH₂), 42.0 118.9, 121.9, 122.6, 126.8, 128.0 (2C) 128.7 (2C) (CH), 112.1, 115.9, 126.4, 132.9, 139.1 153.0, 194.5 (C); EA: C₂₁H₂₁ClN₂O (352.86) ber. C 71.48, H 6.00, N 7.94, gef. C 71.62, H 5.94, N 7.81; MS (ESI +) m/z (%) 463 [M+110]⁺ (22), 375 [M+Na]⁺ (20), 353 [M+H]⁺ (69), 179 [M–173]⁺ (14), 134 [M–C₁₂H₉ClNO]⁺ (100), 91 [M–261]⁺ (23), MS (ESI –) m/z (%) 509 [M+157][–] (20), 351 [M–H][–] (100); HPLC (isokr.): 98.7% bei 254 nm, 98.7% bei 280 nm, t_{ms} = 7.8 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/Puffer 30:70) (System 1); λ_{max} 246 nm, 266 nm, 303 nm.

8-Chlor-3-[(2-ethyl-1*H*-imidazol-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**22g**)

Nach AAV 3 aus 8-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**29**, 120 mg, 0.517 mmol) und 2-Methyl-1*H*-imidazol (150 mg, 1.56 mmol). Nachdem der Niederschlag abfiltriert und aus Methanol umkristallisiert wurde, wurden 40 mg (24%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

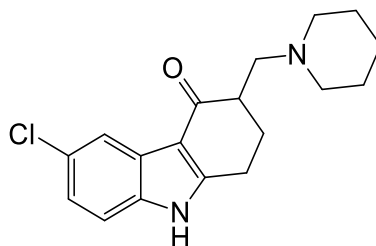
Schmp.: 114–115 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3411 cm⁻¹ (NH), 1621 cm⁻¹ (C=O), 1476 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃), 1.76–1.90 (m, 1H), 1.93–2.07 (m, 1H), 2.60–2.72 (m, 2H), 2.87–3.12 (m, 3H), 3.79–4.22 (m, 1H), 4.48 (dd, *J* = 14.4, 4.6 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.06 (dd, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.15–7.22 (m, 1H, Ar-H), 7.25–7.31 (m, 1H, Ar-H), 7.95 (dd, 1H, Ar-H), 12.25 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz): δ (ppm) = 12.1 (CH₃), 19.2, 21.7, 26.3, 44.4 (CH₂), 46.9, 118.9, 119.9, 122.2, 122.9, 126.3 (CH), 112.0, 116.0, 126.3, 133.1, 148.6, 153.4, 192.3 (C); C₁₈H₁₈ClN₃O (327.81); HR-EIMS *m/z* [M]⁺ ber. 327.11384, gef. 327.11329; EIMS *m/z* (%) 327 (12), 231 (100), 203 (25) 191 (34), 163 (44), 95 (33); MS (ESI +) *m/z* (%) 328 [M+H]⁺ (100), 97 [M–230]⁺ (54); MS (ESI –) *m/z* (%) 326 [M–H][–] (100); HPLC (isokr.): 91.9% bei 254 nm, 91.6% bei 280 nm, *t*_{ms} = 16.3 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 10:90, 0–20 min, 30:70, 20–35 min) (System 1); λ_{\max} 245 nm, 266 nm, 302 nm.

6-Chlor-3-[(dimethylamino)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on-Hydrochlorid (26a . HCl)



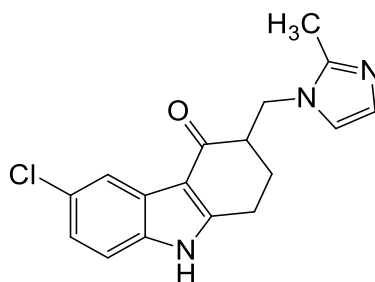
Nach AAV 2 aus 8-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**30**, 121 mg, 0.522 mmol) und Dimethylamin (197 μ L, 1.56 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 18 h bei 55 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Anschließend wurde die freie Base nach AAV 4 als Hydrochlorid gefällt. Nach anschließender Filtration wurden 70 mg (43%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 224–225 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3429 cm^{-1} (NH), 2688 cm^{-1} (NH^+), 1637 cm^{-1} (C=O), 1577 cm^{-1} (C=C), 1480 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.94–2.04 (m, 1H), 2.30–2.38 (m, 1H), 2.85 (s, 3H, CH_3), 2.86 (s, 3H, CH_3), 3.03–3.12 (m, 1H), 3.10–3.19 (m, 3H), 3.59–3.67 (m, 1H), 7.23 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.47 (dd, J = 8.5, 0.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.86–7.91 (m, 1H, Ar-H), 9.62 (s, 1H, NH^+), 12.38 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 42.7, 43.2 (CH_3) 22.0, 27.6, 57.4 (CH_2), 40.8, 113.5, 118.9, 122.7 (CH), 110.4, 125.8, 126.4, 133.8, 154.1, 192.8 (C); $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$ (313.22); HR-EIMS m/z (%) [M-HCl] $^{++}$ ber. 276.10294, gef. 276.10239; EIMS m/z (%) 276 (6), 231 (85), 203 (20), 191 (30), 163 (37), 58 (100), 44 (49); MS (ESI +) m/z (%) 277 [M-Cl^-] $^+$ (100), 58 [$\text{M-C}_{12}\text{H}_9\text{ClNO-Cl}^-$] $^+$ (82); MS (ESI –) m/z (%) 275 [M-HCl-H^-] (100), 230 [M-HCl-36^-] (9); HPLC (isokr.): 95.0% bei 254 nm, 95.2% bei 280 nm, t_{ms} = 6.1 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/Puffer 0–20 min: 20% ACN \rightarrow 30% ACN (linearer Anstieg über die Zeit, System 1); λ_{max} 248 nm, 271 nm, 302 nm.

6-Chlor-3-(piperidin-1-ylmethyl)-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on-Hydrochlorid (26b)

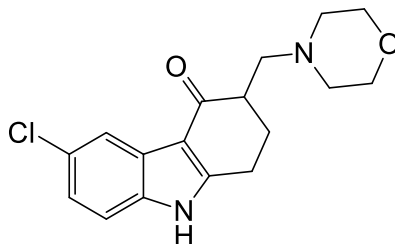
Nach AAV 2 aus 6-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**30**, 150 mg, 0.647 mmol) und Piperidin (193 μ L, 1.95 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 18 h bei 55 °C erhitzt. Nach Umkristallisation aus Methanol wurden 40 mg (19%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 193–194 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ 3216 cm^{-1} (NH), 1627 cm^{-1} (C=O), 1613 cm^{-1} (C=C), 1466 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.35–1.42 (m, 2H), 1.44–1.55 (m, 4H), 1.90–1.99 (m, 1H), 2.13–2.35 (m, 3H), 2.37–2.48 (m, 3H), 2.60–2.69 (m, 2H), 2.93–3.03 (m, 2H), 7.18 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (dd, J = 8.6, 0.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.88–7.92 (m, 1H, Ar-H), 12.03 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 21.3, 24.1, 25.6 (2C), 26.9, 54.2 (2C), 57.9 (CH₂), 43.7, 113.1, 119.1, 122.2 (CH), 111.0, 125.7, 126.0, 134.5, 153.3, 194.4 (C); EA: C₁₈H₂₁ClN₂O (316.29) ber. C 68.24, H 6.68, N 8.84, gef. C 68.16, H 6.35, N 8.63; MS (ESI +) m/z (%) 317 [M+H]⁺ (74), 98 [M–C₁₂H₉ClNO]⁺ (100), MS (ESI –) m/z (%) 315 [M–H][–] (100); HPLC (isokr.): 98.8% bei 254 nm, 98.6% bei 280 nm, t_{MS} = 4.7 min, t_{m} = 2.1 min (ACN/Puffer 30:70) (System 1); λ_{max} 248 nm, 271 nm, 301 nm.

6-Chlor-3-[(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**26c**)

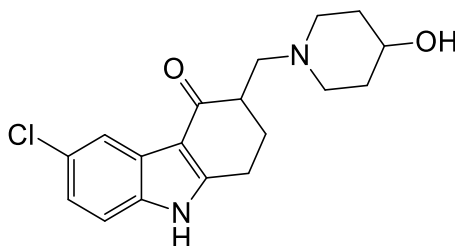
Nach AAV 2 aus 6-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**30**, 113 mg, 0.49 mmol) und 2-Methyl-1*H*-imidazol (123 mg, 1.50 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 6 h bei 100 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Nach Umkristallisation aus Methanol wurden 80 mg (52%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Zers.: 201–202 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ 3437 cm⁻¹ (NH), 1626 cm⁻¹ (C=O), 1582 cm⁻¹ (C=C), 1486 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.77–1.87 (m, 1H), 1.94–2.02 (m, 1H), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.89–2.97 (m, 1H), 2.97–3.04 (m, 2H), 4.08 (dd, *J* = 14.4, 8.5 Hz, 1H), 4.45 (dd, *J* = 14.4, 4.7 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H, Ar-H), 7.06 (s, 1H, Ar-H), 7.21 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.43 (dd, *J* = 8.5, 0.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.88–7.93 (m, 1H, Ar-H), 12.12 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz): δ (ppm) = 12.7 (CH₃), 21.7, 26.3, 44.9 (CH₂), 46.7, 113.2, 119.1, 120.1, 122.5, 126.2 (CH), 110.9, 125.6, 126.2, 134.6, 144.1, 153.6, 192.0 (C); C₁₇H₁₆ClN₃O (313.79) HR-ESIMS *m/z* (%) [M+H]⁺ ber. 314.10547, gef. 314.10595 (100); MS (ESI +) *m/z* (%) 314 [M+H]⁺ (100), 177 [M–136]⁺ (11), 98 [M–215]⁺ (44), 83 [M–231+H]⁺ (12), MS (ESI –) *m/z* (%) 312 [M–H][–] (100); HPLC (isokr.): 99.6% bei 254 nm, 99.8% bei 280 nm, *t*_{ms} = 6.9 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 20:80, 0–20 min, 30:70, 20–35 min) (System 1); λ_{max} 248 nm, 271 nm, 300 nm.

6-Chlor-3-(morpholinomethyl)-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**26d**)

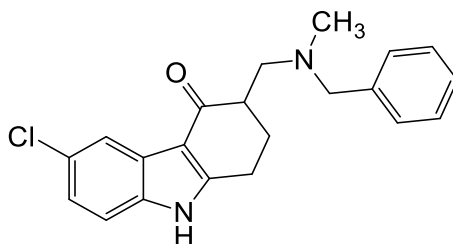
Nach AAV 2 aus 6-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**30**, 150 mg, 0.647 mmol) und Morpholin (170 μ L, 1.97 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 16 h bei 55 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Nach Umkristallisation aus Methanol wurden 44 mg (21%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 216–217 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3428 cm^{-1} (NH), 1625 cm^{-1} (C=O), 1611 cm^{-1} (C=C), 1470 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.92–2.03 (m, 1H), 2.25–2.35 (m, 3H), 2.43–2.50 (m, 3H), 2.64–2.72 (m, 2H), 2.93–3.05 (m, 2H), 3.58 (tt, J = 11.1, 5.6 Hz, 4H), 7.18 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (dd, J = 8.6, 0.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.90 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 12.04 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 21.3, 26.9, 53.5 (2C), 57.6, 66.2 (2C) (CH_2), 43.2, 113.1, 119.1, 122.3 (CH), 111.0, 125.7, 126.0, 134.5, 153.3, 194.2 (C); EA: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (318.80) ber. C 64.05, H 6.01, N 8.79, gef. C 64.20, H 5.92, N 8.69; MS (ESI +) m/z (%) 353 [$\text{M}+35$] $^+$ (23), 319 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (79), 134 [$\text{M}-184$] $^+$ (44), 100 [$\text{M}-\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClNO}$] $^+$ (100), MS (ESI –) m/z (%) 317 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ (100); HPLC (isokr.): 97.9% bei 254 nm, 97.5% bei 280 nm, t_{ms} = 10.1 min, t_{m} = 2.1 min (ACN/Puffer 20:80, 0–20 min, 30:70, 20–35 min) (System 1); λ_{max} 248 nm, 271 nm, 302 nm.

6-Chlor-3-[(4-hydroxypiperidin-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**26e**)

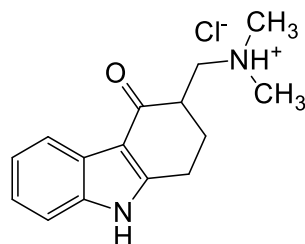
Nach AAV 2 aus 6-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**30**, 113 mg, 0.488 mmol) und 4-Hydroxypiperidin (197 mg, 1.95 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 18 h bei 55 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Nach Umkristallisation aus Methanol wurden 25 mg (15%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 148–149 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3487 cm⁻¹ (NH), 3176 cm⁻¹ (OH), 1631 cm⁻¹ (C=O), 1582 cm⁻¹ (C=C), 1467 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) = 1.30–1.44 (m, 2H), 1.65–1.75 (m, 2H), 1.86–2.00 (m, 2H), 2.09–2.18 (m, 1H), 2.24–2.34 (m, 1H), 2.39–2.48 (m, 1H), 2.58–2.67 (m, 3H), 2.77–2.83 (m, 1H), 2.95–3.02 (m, 2H), 3.39–3.48 (m, 1H), 4.53 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.18 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (dd, *J* = 8.6 Hz, 0.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.89 (dd, *J* = 2.3 Hz, 0.7 Hz, 1H, Ar-H), 12.03 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 126 MHz): δ (ppm) = 21.3, 26.9, 34.4, 34.6, 50.3, 52.0, 57.1 (CH₂), 43.9, 66.5, 113.1, 119.1, 122.2 (CH), 111.0, 125.7, 126.0, 134.5, 153.3, 194.4 (C); C₁₈H₂₁ClN₂O₂ (332.83); HR-ESIMS *m/z* (%) [2M+Na]⁺ ber. 687.24753, gef. 687.24780 (33), [M+Na]⁺ ber. 355.11838, gef. 355.11836 (42), [M-H]⁺ ber. 333.12916, gef. 333.12861 (100); EIMS *m/z* (%) 332 (18), 281 (27), 242 (100); MS (ESI +) *m/z* (%) 333 [M+H]⁺ (100), 114 [M-C₁₂H₉ClNO]⁺ (44), MS (ESI -) *m/z* (%) 331 [M-H]⁻ (100); HPLC (isokr.): 97.3% bei 254 nm, 96.6% bei 280 nm, *t*_{ms} = 5.0 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 20:80, 0–20 min, 30:70, 20–35 min) (System 1); λ_{\max} 248 nm, 271 nm, 302 nm.

3-[[Benzyl(methyl)amino]methyl]-6-chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**26f**)

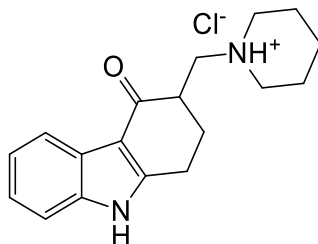
Nach AAV 2 aus 6-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**30**, 150 mg, 0.647 mmol) und *N*-Benzylmethylamin (251 μ L, 1.95 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 18 h bei 55 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Nach Einengung am Rotationsverdampfer wurden 85 mg (37%) eines beigen kristallinen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 184–185 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ 3420 cm^{-1} (NH), 1627 cm^{-1} (C=O), 1613 cm^{-1} (C=C), 1469 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) = 1.92–2.03 (m, 1H), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.31–2.38 (m, 1H), 2.51–2.58 (m, 1H), 2.63–2.72 (m, 2H), 2.84–2.98 (m, 2H), 3.34–3.41 (m, 1H), 3.64 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 7.17 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.21–7.27 (m, 1H, Ar-H), 7.27–7.34 (m, 4H, Ar-H), 7.40 (dd, J = 8.6 Hz, > 1 Hz, 1H, Ar-H), 7.89 (dd, J = 2.1 Hz, > 1 Hz, 1H, Ar-H), 12.01 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ (ppm) = 42.0 (CH₃), 20.9, 26.5, 56.1, 61.7 (CH₂), 44.2, 113.1, 119.1, 122.3, 126.7, 128.0 (2C), 128.6 (2C) (CH), 110.9, 125.7, 126.0, 134.5, 139.1, 153.2, 194.3 (C); EA: C₂₁H₂₁ClN₂O (352.86) ber. C 71.48, H 6.00, N 7.94, gef. C 71.11, H 6.04, N 7.85; MS (ESI +) m/z (%) 353 [M+H]⁺ (62), 134 [M–C₁₂H₉ClNO]⁺ (100); HPLC (isokr.): 99.6% bei 254 nm, 99.8% bei 280 nm, t_{ms} = 7.7 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/Puffer 30:70) (System 1); λ_{max} 249 nm, 271 nm, 302 nm.

3-[(Dimethylamino)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on-Hydrochlorid (**27a** · HCl)

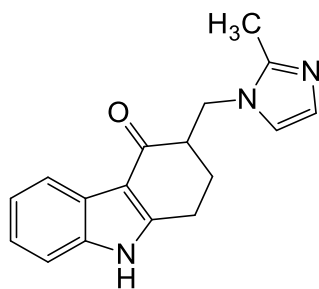
Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine publizierte Methode von CYJON und GUTMAN ^[163]. 1,2,3,9-Tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**33**, 2.00 g, 10.8 mmol) und Paraformaldehyd (770 mg, 25.7 mmol) wurden in gekühltem DMF (4 mL, 0 °C) mit konz. H₂SO₄ (0.5 mL) versetzt und anschließend für 2 h bei 90 °C erhitzt. Danach wurde schrittweise für weitere 2 h auf 110 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden dem Reaktionsansatz Wasser (10 mL) und Dichlormethan (50 mL) zugesetzt. Nach fünfmaliger Extraktion mit wässriger H₂SO₄ (1% V/V, 20 mL) wurden die vereinigten schwefelsauren Phasen mit NaOH-Lsg. (5 M) alkalisiert. Anschließend wurde zweimal mit Dichlormethan extrahiert (jeweils 50 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (50 mL) und Wasser (50 mL) gewaschen und anschließend über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer wurde nach AAV 4 das Hydrochlorid gefällt, abgesaugt und getrocknet. Es wurden 320 mg (11%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 197–198 °C; (Lit. ^[161] : 194–196) IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ 3411 cm⁻¹ (NH), 2655 cm⁻¹ (NH⁺), 1623 cm⁻¹ (C=O), 1581 cm⁻¹ (C=C), 1474 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) = 1.92–2.04 (m, 1H, CH₂), 2.27–2.36 (m, 1H, CH₂), 2.85 (s, 3H, CH₃), 2.86 (s, 3H, CH₃), 2.98–3.19 (m, 4H), 3.58–3.67 (m, 1H, CH₂), 7.14–7.24 (m, 2H, Ar-H), 7.40–7.47 (m, 1H, Ar-H), 7.91–7.99 (m, 1H, Ar-H), 9.60 (s, 1H, NH⁺), 12.18 (s, 1H, NH); die individuelle Zuordnung erfolgte durch ein HSQC-Experiment; ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 126 MHz): δ (ppm) = 42.5, 43.4 (CH₃) 22.1, 27.7, 57.7 (CH₂), 40.6, 110.8, 119.9, 121.9, 122.8 (CH), 111.8, 124.3, 136.2, 152.3, 192.9 (C); C₁₅H₁₉ClN₂O (278.78); HR-ESIMS *m/z* (%) [2M–2HCl+Na⁺]⁺ ber. 507.27305, gef. 507.27317 (4); [M–Cl]⁺ ber. 243.14919, gef. 243.14931 (100); MS (APCI +) *m/z* (%) 300 (45), 242 [M–Cl]⁺ (100), 198 (28), 58 (100), MS (APCI –): *m/z* (%) = 241 [M–2H⁺–Cl][–] (23), 196 (100); HPLC (isokr.): 99.6% bei 254 nm, 99.6% bei 280 nm, *t*_{ms} = 7.3 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 10:90) (System 1); λ_{max} 244 nm, 266 nm, 304 nm.

3-(Piperidin-1-ylmethyl)-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on-Hydrochlorid (**27b** · HCl)

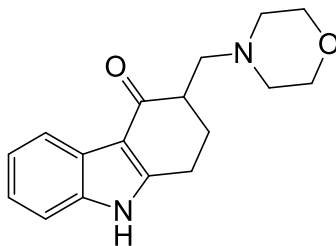
Nach AAV 2 aus 3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**31**, 211 mg, 1.07 mmol) und Piperidin (320 μ L, 3.24 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 18 h bei 55 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Anschließend wurde die freie Base nach AAV 4 als Hydrochlorid gefällt. Nach anschließender Filtration wurden 197 mg (58%) eines beige-orangen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 183–184 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ 3430 cm^{-1} (NH), 2627 cm^{-1} (NH⁺), 1614 cm^{-1} (C=O), 1582 cm^{-1} (C=C), 1472 cm^{-1} ; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.33–1.54 (m, 1H), 1.60–1.75 (m, 1H), 1.75–1.88 (m, 4H), 1.93–2.09 (m, 1H), 2.31–2.44 (m, 1H), 2.92–3.05 (m, 2H), 3.05–3.20 (m, 4H), 3.48–3.66 (m, 3H), 7.06–7.26 (m, 2H, Ar-H), 7.33–7.52 (m, 1H, Ar-H), 7.86–8.02 (m, 1H, Ar-H), 9.46 (s, 1H, NH⁺), 12.13 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz): δ (ppm) = 21.3, 22.1, 22.20, 22.23, 28.5, 52.6, 52.9, 56.7 (CH₂), 41.0, 110.9, 120.0, 121.9, 122.8 (CH), 111.8, 124.5, 136.2, 152.6, 192.3 (C); C₁₈H₂₃ClN₂O (318.85) HR-EIMS *m/z* [M–HCl]⁺ ber. 282.17321, gef. 282.17266; EIMS *m/z* (%) 282 (44), 197 (100), 168 (34), 157 (31), 129 (49), 98 (45), 84 (40), 44 (19); MS (ESI +) *m/z* (%) 393 [M–HCl+111]⁺ (14), 283 [M–Cl]⁺ (90), 177 [M–HCl–105]⁺ (16), 98 [M–C₁₂H₁₀NO–Cl]⁺ (100); HPLC (isokr.): 98.9% bei 254 nm, 99.1% bei 280 nm, *t*_{ms} = 4.6 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 20:80) (System 1); λ_{max} 244 nm, 267 nm, 304 nm.

3-[(2-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**27c**)

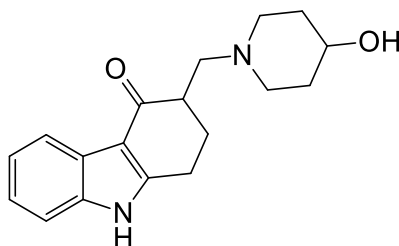
Nach AAV 2 aus 3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**31**, 513 mg, 2.60 mmol) und 2-Methyl-1*H*-imidazol (577 mg, 7.03 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 20 h bei 100 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Nach Einengung am Rotationsverdampfer wurden 640 mg (88%) eines farblosen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 202–204 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3404 cm⁻¹ (NH), 1632 cm⁻¹ (C=O), 1585 cm⁻¹ (C=C), 1473 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ (ppm) = 1.75–1.87 (m, 1H), 1.93–2.03 (m, 1H), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.87–2.93 (m, 1H), 2.97–3.03 (m, 2H), 4.07 (dd, *J* = 14.4, 8.6 Hz, 1H), 4.46 (dd, *J* = 14.4, 4.6 Hz, 1H), 6.69–6.76 (m, 1H, Ar-H), 7.03–7.08 (m, 1H, Ar-H), 7.12–7.22 (m, 2H, Ar-H), 7.35–7.44 (m, 1H, Ar-H), 7.94–8.02 (m, 1H, Ar-H), 11.91 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 126 MHz): δ (ppm) = 12.8 (CH₃), 21.7, 26.4, 45.0 (CH₂), 46.7, 111.6, 120.1 (2C), 121.6, 122.6, 126.3 (CH), 111.3, 124.5, 136.1, 144.1, 152.2, 191.9 (C); C₁₇H₁₇N₃O (279.34) HR-EIMS *m/z* [M]⁺⁺ ber. 279.13716, gef. 279.13661; EIMS *m/z* (%) 279 (20), 197 (100), 168 (39), 157 (35), 129 (60), 82 (62); MS (ESI +) *m/z* (%) 280 [M+H]⁺ (100), 83 [M–197+H]⁺ (75); HPLC (isokr.): >99% at 254 nm, >99% at 280 nm, *t*_{ms} = 12.2 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 10:90) (System 1); λ_{\max} 244 nm, 267 nm, 303 nm.

3-(Morpholinomethyl)-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**27d**)

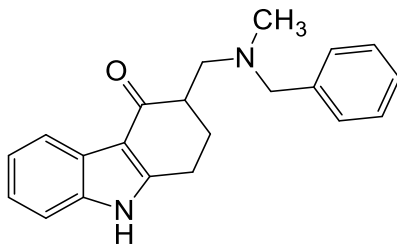
Nach AAV 2 aus 3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**31**, 200 mg, 1.02 mmol) und Morpholin (280 μ L, 3.25 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 18 h bei 55 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Nach Umkristallisation aus Toluol wurden 180 mg (62%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 223–224 °C (Lit.: 227–229 °C ^[161]); IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ 3411 cm^{-1} (NH), 1610 cm^{-1} (C=O), 1581 cm^{-1} (C=C), 1456 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.92–2.02 (m, 1H), 2.25–2.35 (m, 3H), 2.43–2.49 (m, 3H), 2.62–2.72 (m, 2H), 2.92–3.07 (m, 2H, CH₂), 3.53–3.63 (m, 4H), 7.10–7.20 (m, 2H, Ar-H), 7.36–7.41 (m, 1H, Ar-H), 7.92–7.97 (m, 1H, Ar-H), 11.84 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 21.3, 27.0, 53.5 (2C), 57.7, 66.2 (2C) (CH₂), 43.3, 111.5, 120.1, 121.4, 122.3 (CH), 111.4, 124.6, 136.0, 151.9, 194.1 (C); EA: C₁₇H₂₀N₂O₂ (284.36) ber. C 71.81, H 7.09, N 9.85, gef. C 71.82, H 6.90, N 9.51; MS (ESI +) m/z (%) 598 [M+314]⁺ (15), 395 [M+111]⁺ (15), 307 [M+Na]⁺ (23), 285 [M+H]⁺ (100), 100 [M–C₁₂H₁₀NO]⁺ (100), MS (ESI –) m/z (%) 319 [M+25][–] (16), 283 [M–H][–] (100); HPLC (isokr.): 99.8% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm, t_{ms} = 9.4 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/Puffer 10:90) (System 1); λ_{max} 244 nm, 266 nm, 304 nm.

3-[(4-Hydroxypiperidin-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**27e**)

Nach AAV 2 aus 3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**31**, 200 mg, 1.02 mmol) und 4-Hydroxypiperidin (311 mg, 3.07 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 16 h bei 55 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Nach Einengung am Rotationsverdampfer wurden 250 mg (82%) eines farblosen amorphen Feststoffes erhalten.

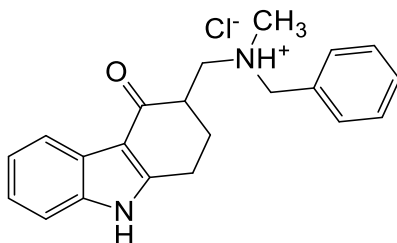
Schmp.: 195–197 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3411 cm⁻¹ (NH), 1620 cm⁻¹ (C=O), 1586 cm⁻¹ (C=C), 1476 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.28 – 1.50 (m, 2H), 1.61–1.79 (m, 2H), 1.83–2.03 (m, 2H), 2.06–2.20 (m, 1H), 2.21–2.35 (m, 1H), 2.37–2.47 (m, 1H), 2.55–2.70 (m, 3H), 2.7 –2.87 (m, 1H), 2.90–3.02 (m, 2H), 3.38–3.51 (m, 1H, CH-OH), 4.54 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, OH), 7.08–7.20 (m, 2H, Ar-H), 7.29–7.46 (m, 1H, Ar-H), 7.90–7.96 (m, 1H, Ar-H), 11.83 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz): δ (ppm) = 21.3, 27.1, 34.5, 34.6, 50.3, 52.3, 57.3 (CH₂), 44.0, 66.4, 111.4, 120.07, 121.4, 122.3 (CH), 111.4, 124.6, 136.0, 151.9, 194.3 (C); C₁₈H₂₂N₂O₂ (298.39); HR-ESIMS *m/z* (%) [2M+Na⁺]⁺ ber. 619.32577, gef. 619.32559 (11), [M+185]⁺ gef. 484.50863 (9), [M+Na⁺]⁺ ber. 321.15740, gef. 321.15733 (36), [M+H]⁺ ber. 299.17540, gef. 299.17569 (100); MS (ESI +) *m/z* (%) 321 [M+Na⁺]⁺ (37), 299 [M+H]⁺ (100), 114 [M-C₁₂H₁₀NO]⁺ (44), 86 [M-212]⁺ (28); HPLC (isokr.): 99.9% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm, *t*_{ms} = 9.0 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 10:90) (System 1); λ_{\max} 244 nm, 266 nm, 304 nm.

3-[[Benzyl(methyl)amino]methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**27f**)

Nach AAV 2 aus 3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**31**, 165 mg, 0.838 mmol) und *N*-Benzylmethylamin (325 μ L, 2.52 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 18 h bei 55 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Nach Einengung am Rotationsverdampfer wurden 252 mg (94%) eines farblosen kristallinen Feststoffes erhalten.

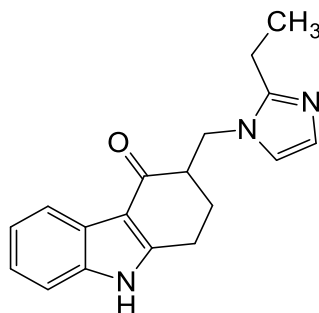
Schmp.: 157–158 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3248 cm^{-1} (NH), 1634 cm^{-1} (C=O), 1581 cm^{-1} (C=C), 1473 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 1.92–2.06 (m, 1H), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.28 – 2.41 (m, 1H), 2.5 – 2.59 (m, 1H), 2.60–2.73 (m, 2H), 2.80–2.99 (m, 2H), 3.37 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.64 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 7.08–7.19 (m, 2H, Ar-H), 7.19–7.36 (m, 5H, Ar-H), 7.31–7.42 (m, 1H, Ar-H), 7.88–7.98 (m, 1H, Ar-H), 11.81 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 42.1 (CH₃), 20.9, 26.7, 56.3, 61.8 (CH₂), 44.3, 111.5, 120.1, 121.4, 122.4, 126.8, 128.1 (2C), 128.7 (2C) (CH), 111.3, 124.6, 136.0, 139.2, 151.3, 194.3 (C); EA: C₂₁H₂₂N₂O (318.42) ber. C 79.21, H 6.96, N 8.80, gef. C 79.17, H 6.88, N 8.63; MS (ESI +) m/z (%) 429 [M+111]⁺ (12), 341 [M+Na]⁺ (70), 319 [M+H]⁺ (40), 134 [M–C₁₂H₁₀NO]⁺ (76), 91 [M–227]⁺ (100); (ESI –) m/z (%) 317 [M–H][–] (100); HPLC (isokr.): 100% bei 254 nm, 100% bei 280 nm, t_{ms} = 7.1 min, t_{m} = 1.1 min (ACN/Puffer 25:75) (System 1); λ_{max} 245 nm, 267 nm, 304 nm.

3-[[Benzyl(methyl)amino]methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on-Hydrochlorid (27f . HCl)



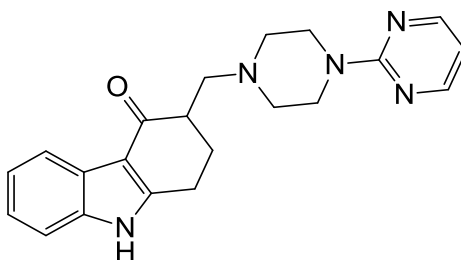
Nach AAV 4 aus 3-[[Benzyl(methyl)amino]methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**27f**, 100 mg, 0.314 mmol). Nach Filtration und anschließender Trocknung wurden 57 mg (52%) eines farblosen amorphen Feststoffes erhalten. Es wurde eine Mischung zweier Rotamere erhalten.

Schmp.: 192–193 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3429 cm⁻¹ (NH), 2862 cm⁻¹ (NH⁺), 1630 cm⁻¹ (C=O), 1582 cm⁻¹ (C=C), 1473 cm⁻¹ (HN–C=C–C); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.79–2.10 (m, 1H), 2.23–2.30 (m, 0.5H), 2.38–2.46 (m, 0.5H), 2.77 (d, *J* = 5.1 Hz, 1.5H, CH₃), 2.83 (d, *J* = 4.9 Hz, 1.5H, CH₃), 2.94–3.30 (m, 4H), 3.54–3.61 (m, 0.5H), 3.61–3.70 (m, 0.5H), 4.27–4.59 (m, 2H), 7.07–7.28 (m, 2H, Ar-H), 7.38–7.45 (m, 1H, Ar-H), 7.46–7.55 (m, 3H, Ar-H), 7.60–7.69 (m, 2H, Ar-H), 7.90–7.99 (m, 1H), 9.82 (s, 0.5H, NH⁺), 10.25 (s, 0.5H, NH⁺), 12.14 (s, 0.5H, NH), 12.20 (s, 0.5H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz): δ (ppm) = (40.1, 40.2) (CH₃), (22.0, 22.3), (28.0, 28.1), (55.3, 55.4), (58.7, 59.4) (CH₂), 41.1 (2C), (111.75, 111.83), (119.86, 119.92), (121.8, 121.9), (122.7, 122.8), (128.78, 128.79), (129.5, 129.25), 131.2 (2C), 131.4 (2C) (CH), (110.7, 110.8), (124.3, 124.4), (129.8, 129.9), (136.1, 136.2), (152.5, 152.9), (192.0, 193.3) (C); C₂₁H₂₃ClN₂O (354.88) HR-EIMS *m/z* [M–HCl]⁺⁺ ber. 318.17321, gef. 318.17266; EIMS *m/z* (%) 318 (3), 197 (100), 168 (37), 157 (32), 134 (29), 129 (51), 120 (73), 91 (81), 44 (52); MS (ESI +) *m/z* (%) 341 [M–HCl+Na]⁺ (14), 319 [M–Cl]⁺ (28), 163 [M–HCl–155]⁺ (23), 134 [M–C₁₂H₁₀NO–Cl]⁺ (34), 90 [M–HCl–228]⁺ (100), 71 [M–HCl–247]⁺ (38); (ESI –) *m/z* (%) 317 [M–HCl–H][–] (100); HPLC (isokr.): 99.5% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm, *t*_{ms} = 7.8 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 30:70) (System 1); λ_{\max} 245 nm, 267 nm, 304 nm.

3-[(2-Ethyl-1*H*-imidazol-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**27g**)

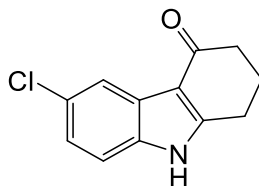
Nach AAV 3 aus 3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**31**, 328 mg, 1.66 mmol) und 2-Methyl-1*H*-imidazol (320 mg, 3.44 mmol). Nachdem der Niederschlag abfiltriert und aus Methanol umkristallisiert wurde, wurden 28 mg (6%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 208–209 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3398 cm⁻¹ (NH), 1637 cm⁻¹ (C=O), 1585 cm⁻¹ (C=C), 1472 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.76–1.86 (m, 1H), 1.94–2.03 (m, 1H), 2.66 (qd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 2H), 2.85–2.97 (m, 1H), 2.97–3.05 (m, 2H), 4.06 (dd, *J* = 14.3, 8.7 Hz, 1H), 4.48 (dd, *J* = 14.3, 4.5 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.06 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.13–7.21 (m, 2H, Ar-H), 7.37–7.43 (m, 1H, Ar-H), 7.95–8.01 (m, 1H, Ar-H), 11.91 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz): δ (ppm) = 12.1 (CH₃), 19.3, 21.7, 26.4, 44.6 (CH₂), 46.9, 111.6, 119.9, 120.0, 121.6, 122.6, 126.3 (CH), 111.3, 124.5, 136.1, 148.6, 152.2, 191.9 (C); C₁₈H₁₉N₃O (293.37) HR-EIMS *m/z* [M]⁺⁺ ber. 293.15281, gef. 293.15226; EIMS *m/z* (%) 293 (22), 197 (100), 168 (34), 157 (25), 129 (46), 95 (35); MS (ESI +) *m/z* (%) 294 [M+H]⁺ (100); HPLC (isokr.): 98.7% bei 254 nm, 99.2% bei 280 nm, *t*_{ms} = 3.7 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 20:80) (System 1); λ_{\max} 244 nm, 266 nm, 302 nm.

3-{[4-(Pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl]methyl}-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**27h**)

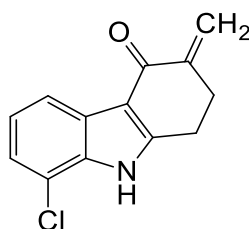
Nach AAV 2 aus 3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**31**, 200 mg, 1.02 mmol) und 1-(2-Pyrimidyl)piperazin (502 mg, 3.06 mmol) in 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 18 h bei 55 °C erhitzt. Im Anschluss wurde der Niederschlag abfiltriert und extrahiert. Nach Einengung am Rotationsverdampfer wurden 90 mg (24%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 170–171 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3442 cm⁻¹ (NH), 1612 cm⁻¹ (C=O), 1586 cm⁻¹ (C=C), 1456 cm⁻¹ (HN–C=C–C); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 1.96–2.06 (m, 1H), 2.32–2.40 (m, 3H), 2.52–2.59 (m, 3H), 2.67–2.76 (m, 2H), 2.95–2.07 (m, 2H), 3.69–3.78 (m, 4H), 6.62 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.10–7.19 (m, 2H, Ar-H), 7.36–7.41 (m, 1H, Ar-H), 7.92–7.97 (m, 1H, Ar-H), 8.32–8.38 (m, 2H, Ar-H), 11.85 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz): δ (ppm) = 21.3, 27.1, 43.3 (2C), 52.8 (2C), 57.4 (CH₂), 43.6, 110.0, 111.5, 120.1, 121.4, 122.3, 157.8 (2C) (CH), 111.4, 124.6, 136.0, 151.9, 161.1, 194.1 (C); C₂₁H₂₃N₅O (361.45) HR-ESIMS *m/z* (%) [2M+Na⁺]⁺ ber. 745.36974, gef. 745.37047 (85), [M+Na⁺]⁺ ber. 384.17948, gef. 384.17951 (100), [M+H]⁺ ber. 362.19754, gef. 362.19786 (100); MS (ESI +) *m/z* (%) 384 [M+Na⁺]⁺ (20), 362 [M+H]⁺ (81), 177 [M–244]⁺ (100), MS (ESI –) *m/z* (%) 360 [M–H][–] (100), 113 [M–171][–] (15); HPLC (isokr.): 99.7% bei 254 nm, 99.6% bei 280 nm, *t*_{ms} = 6.7 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 20:80) (System 1); λ_{\max} 241 nm, 267 nm, 304 nm.

6-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**28**)

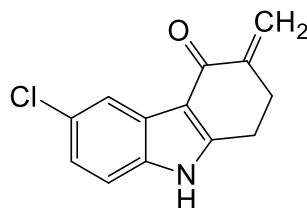
Die Synthese erfolgte in Anlehnung an LI und VINCE ^[160]. 1,3-Cyclohexandion (**37**, 2.57 g, 22.9 mmol) wurde in Wasser (30 mL) gegeben und anschließend portionsweise mit 4-Chlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (**39**, 4.10 g, 22.9 mmol) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Phenylhydrazon wurde abgesaugt und nach zweistündiger Trocknung wurde Trifluoressigsäure (20 mL) zugesetzt und für 14 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Trifluoressigsäure durch Einengung am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Umkristallisation aus Acetonitril/Wasser (50:50) wurden 1.30 g (26%) eines amorphen dunklen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 291–292 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 1630 cm^{-1} (C=O), 1577 cm^{-1} (C=C), 1469 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) = 2.16–2.06 (m, 2H, CH_2), 2.44 (m, 2H, CH_2), 2.97 (t, J = 6.2 Hz, 2H, CH_2), 7.18 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.42 (dd, J = 0.6 Hz, 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.90 (m, 1H, Ar-H), 12.05 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ (ppm) = 22.6, 23.2, 37.5 (CH_2), 113.1, 119.1, 122.3 (CH), 111.3, 125.6, 126.0, 134.3, 153.6, 192.9 (C); $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClNO}$ (219.67) ber. C 65.61, H 4.59, N 6.38, gef. C 65.99, H 4.33, N 6.57; MS (APCI +): m/z (%) = 220 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (100), MS (APCI –): m/z (%) = 218 [$\text{M}-\text{H}$][–] (100); HPLC (isokr.): 99.8% bei 254 nm und 100% bei 280 nm, t_{ms} = 8.7 min, t_{m} = 1.2 min (ACN/Puffer 30:70); (System 1); λ_{max} : 247 nm, 270 nm, 293 nm; HPLC (grad.): 99.8% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, t_{ms} = 9.5 min, t_{m} = 1.2 min (System 2); λ_{max} : 221 nm, 246 nm, 270 nm.

8-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**29**)

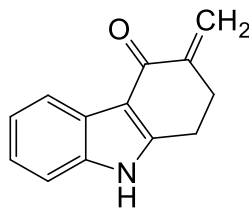
Nach AAV 1 aus 8-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**21**, 1.03 g, 4.70 mmol) und *N,N*-Dimethylmethyleniminiumchlorid (**41**, 500 mg, 5.34 mmol) in DMF (5 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 4 h bei 130 °C erhitzt. Nach Filtration wurden 800 mg (65%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 225–227 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3434 cm⁻¹ (NH), 1647 cm⁻¹ (C=O), 1617 cm⁻¹ (C=C), 1469 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.87–2.96 (m, 2H, CH₂), 3.05–3.12 (m, 2H, CH₂), 5.41–5.46 (m, 1H, C=CH₂), 5.91–5.95 (m, 1H, C=CH₂), 7.19 (m, 1H, Ar-H), 7.29 (dd, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.98 (dd, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H, Ar-H), 12.34 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz): δ (ppm) = 22.9, 30.6, 118.5 (CH₂), 119.3, 122.4, 123.0 (CH), 113.1, 116.1, 126.7, 133.4, 144.11, 153.6, 182.5 (C); C₁₃H₁₀ClNO (231.68); HR-EIMS *m/z* [M]⁺⁺ ber. 231.04509, gef. 231.04454; EIMS *m/z* (%) 231 (100), 191 (34), 163 (37), 44 (30); MS (APCI +) *m/z* (%) 232 [M+H]⁺ (100), MS (APCI –): *m/z* (%) = 230 [M–H][–] (100); HPLC (isokr.): 96.3% at 254 nm, 96.7% at 280 nm, *t*_{ms} = 12.4 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 30:70) (System 1); λ_{\max} 252 nm, 274 nm, 320 nm.

6-Chlor-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**30**)

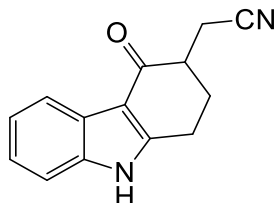
Nach AAV 1 aus 6-Chlor-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**28**, 1.20 g, 5.46 mmol) und *N,N*-Dimethylmethyleniminiumchlorid (**41**, 603 mg, 6.45 mmol) in DMF (4 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 4 h bei 130 °C erhitzt. Nach Filtration wurden 950 mg (75%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Zers.: 255–259 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3434 cm⁻¹ (NH), 1649 cm⁻¹ (C=O), 1598 cm⁻¹ (C=C), 1469 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.87–2.94 (m, 2H, CH₂), 3.07 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 5.40 – 5.45 (m, 1H, C=CH₂), 5.90 – 5.95 (m, 1H, C=CH₂), 7.22 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.45 (dd, *J* = 8.6, 0.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.97 (m, 1H, Ar-H), 12.20 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz): δ (ppm) = 22.9, 30.5, 118.4 (CH₂), 113.3, 119.4, 122.7 (CH), 111.9, 126.0, 126.3, 134.9, 144.0, 153.7, 182.2 (C); C₁₃H₁₀ClNO (231.68); HR-ESIMS *m/z* [MCl³⁷]⁺ ber. 233.04214, gef. 233.04192; EIMS *m/z* (%) 231 (100), 191 (27), 163 (33), 128 (13), 84 (15), 44 (19); MS (APCI +) *m/z* (%) 232 [M+H]⁺ (100), 204 (11), MS (APCI –) *m/z* (%) = 230 [M–H][–] (100); HPLC (isokr.): 97.4% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm, *t*_{ms} = 12.9 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 30:70) (System 1); λ_{\max} 257 nm, 281 nm, 319 nm; HPLC (grad.): 99.8% bei 254 nm, 99.8% bei 280 nm, *t*_{ms} = 3.2 min, *t*_m = 1.1 min (System 2); λ_{\max} 257 nm, 281 nm, 317 nm.

3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**31**)

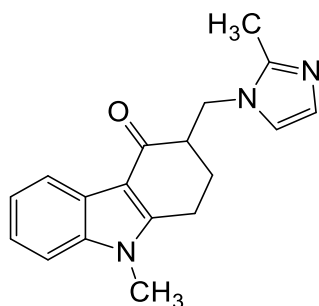
Nach AAV 1 aus 1,2,3,4-Tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**33**, 1.79 g, 9.68 mmol) und *N,N*-Dimethylmethyleniminiumchlorid (**41**, 1.03 g, 11.0 mmol) in DMF (2 mL). Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 130 °C erhitzt. Nach Filtration wurden 1.32 g (69%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 207–208 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3434 cm⁻¹ (NH), 1646 cm⁻¹ (C=O), 1577 cm⁻¹ (C=C), 1463 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 2.86–2.97 (m, 2H, CH₂), 3.06 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 5.36–5.42 (m, 1H, C=CH₂), 5.88–5.94 (m, 1H, C=CH₂), 7.11–7.25 (m, 2H, Ar-H), 7.37–7.47 (m, 1H, Ar-H), 7.98–8.08 (m, 1H, Ar-H), 12.00 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz): δ (ppm) = 23.0, 30.7, 117.8 (CH₂), 111.6, 120.4, 121.7, 122.8 (CH), 112.4, 124.9, 136.4, 144.5, 152.4, 182.2 (C); EA: C₁₃H₁₁NO (197.24) ber. C 79.17, H 5.62, N 7.10, gef. C 78.64, H 5.50, N 7.09; MS (APCI +) *m/z* (%) 198 [M+H]⁺ (100), 170 [M–27]⁺ (30), MS (APCI –) *m/z* (%) = 196 [M–H][–] (100); HPLC (isokr.): 98.7% bei 254 nm, 98.4% bei 280 nm, *t*_{ms} = 5.4 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 30:70) (System 1); λ_{\max} 250 nm, 274 nm, 320 nm; HPLC (grad.): 98.9% bei 254 nm, 98.8% bei 280 nm, *t*_{ms} = 8.8 min, *t*_m = 1.1 min (System 2); λ_{\max} 250 nm, 274 nm, 320 nm.

2-(4-Oxo-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-carbazol-3-yl)acetonitril (32)

3-Methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**31**, 224 mg, 1.14 mmol) wurde in einer Mischung aus 1,4-Dioxan/Wasser (1:1 V/V, 4 mL) suspendiert. Anschließend wurde Kaliumcyanid (222 mg, 3.41 mmol) zugesetzt und für 24 h bei 55 °C gerührt. Nachdem der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abkühlt war, wurde mit Ethylacetat (3x50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaHCO₃-Lsg (5%, 50 mL), wässriger H₂SO₄ (10% V/V, 50 mL) und Wasser (50 mL) nacheinander gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet. Anschließend wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und aus Toluol umkristallisiert. Es wurden 180 mg (70%) eines beigen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 250–251 °C; IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ 3240 cm⁻¹ (NH), 2247 cm⁻¹ (CN), 1627 cm⁻¹ (C=O), 1582 cm⁻¹ (C=C), 1469 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.97–2.14 (m, 1H), 2.28–2.40 (m, 1H), 2.78–2.98 (m, 3H), 2.99–3.20 (m, 2H), 7.10–7.22 (m, 2H, Ar-H), 7.37–7.45 (m, 1H, Ar-H), 7.91–8.08 (m, 1H, Ar-H), 11.96 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz): δ (ppm) = 17.4, 22.3, 28.8 (CH₂), 42.3, 111.7, 120.0, 121.7, 122.7 (CH), 110.9, 119.8, 124.5, 136.2, 152.4, 191.0 (C); C₁₄H₁₂N₂O (224.26) HR-EIMS *m/z* [M]⁺ ber. 224.09496, gef. 224.09441; EIMS *m/z* (%) 224 (37), 197 (13), 157 (97) 129 (57); MS (APCI +) *m/z* (%) 225 [M+H]⁺ (100), 198 [M-CN]⁺ (23), 185 [M-39]⁺ (29), 157 [M-67]⁺ (24); MS (APCI -): *m/z* (%) = 223 [M-H]⁻ (100); HPLC (isokr.): 99.6% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm, *t*_{ms} = 4.7 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/H₂O 30:70) (System 2); λ_{\max} 216 nm, 244 nm, 267 nm, 300 nm; HPLC (Gradient): 98.9% bei 254 nm, 99.0% bei 280 nm, *t*_{ms} = 8.5 min, *t*_m = 1.1 min (System 2); λ_{\max} 220 nm, 243 nm, 269 nm, 300 nm.

9-Methyl-3-[(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-on (**42**)

Ondansetron-Hydrochlorid·2 H₂O (**42** · HCl, 1.01 g, 2.76 mmol) wurde in Dichlormethan (50 mL) suspendiert und anschließend dreimal mit NaOH-Lsg (1%, 30 mL) extrahiert. Im Anschluss wurden die vereinigten Dichlormethan-Phasen am Rotationsverdampfer eingeeengt. Es wurden 500 mg (62%) eines farblosen amorphen Feststoffes erhalten.

Schmp.: 227–228 °C (Lit. ^[184]: 231–232); IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ 3390 cm⁻¹ (NH), 1623 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) = 1.72–1.88 (m, 1H), 1.96–2.08 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.83–3.00 (m, 2H), 3.06–3.17 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 4.08 (dd, *J* = 14.3, 8.5 Hz, 1H), 4.44 (dd, *J* = 14.3, 4.7 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.17–7.30 (m, 2H), 7.49–7.58 (m, 1H), 7.99–8.07 (m, 1H).; ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz): δ (ppm) = 12.8, 29.8 (CH₃), 20.5, 25.9, 45.0 (CH₂), 46.5, 110.3, 120.1, 120.1, 122.1, 122.6, 126.4 (CH), 110.9, 124.2, 137.4, 144.1, 152.8, 191.7 (C); EA: C₁₈H₁₉N₃O (293.37) ber. C 73.69, H 6.53, N 14.32, gef. C 73.82, H 6.36, N 14.05; HPLC (isokr.): 99.2% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm, *t*_{ms} = 4.9 min, *t*_m = 1.1 min (ACN/Puffer 20:80) (System 1); λ_{max} 248 nm, 267 nm, 308 nm.

8.3 Molekulares *docking*

Nach Evaluation der *Redocking*-Studien wurde die Co-Kristallstruktur der Proteinkinase DYRK1A mit Inhibitor **19** ausgewählt (PDB: 4YLJ^[50]). Diese wurde von der PDB-Datenbank heruntergeladen und im .pdb-Dateiformat abgespeichert. Präpariert wurde die Co-Kristallstruktur mit MOE^[154] (Version 2015.1001). Bei der Präparation werden fehlende Atome hinzugefügt, das Protein protoniert und die Ausrichtung der Seitenketten von Asp, Glu und His angepasst. Nach einer Konformationsanalyse im Zuge einer Energieminimierung wurde das Protein als .mol2-Datei gespeichert. Beide Stereoisomere der Mannich-Basen und alle weiteren untersuchten Verbindungen wurden ebenfalls mit MOE erstellt, energieminiert und als .mol2-Datei gespeichert. Die *docking*-Experimente wurden mit GOLD^[149] durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das präparierte Protein in GOLD geladen und fehlende Protonen hinzugefügt. Dann wurden alle Wassermoleküle, die nicht in der Nähe der ATP-Bindetasche lokalisiert waren, gelöscht. Auch alle co-kristallisierten Liganden wurden entfernt. Der Referenzligand diente als Ausgangsposition für einen 10 Å-Bereich zur Definition der ATP-Bindetasche für die *docking*-Studien. Zur Bewertung der einzelnen *docking*-Posen wurde die ChemScore-Funktion mit einem Kinase-*template* verwendet.^[150] Die *search efficiency* betrug während aller Versuche 200%. Die Anzahl der GA *runs* lag bei allen Durchgängen bei zehn. Zusätzlich wurden die Funktionen „*generate diverse solutions*“ aktiviert und die Funktion „*allow early termination*“ deaktiviert. Alle Untersuchungen wurden außerdem ohne im Vorfeld definierte Interaktionen (*constraints*) vorgenommen. Für die Wassermoleküle im Bereich der ATP-Bindetasche wurde die Option „*toggle*“ ausgewählt, wodurch sie für GOLD als optional definiert wurden. Alle Ergebnisse wurden mit UCSF Chimera^[121] (Version 1.13.1) evaluiert und visualisiert.

8.4 Proteinkinaseassays

Die Enzymassays zur Bestimmung der Hemmaktivitäten wurde in einer 384-*well-plate* durchgeführt mit dem ADP-GloTM-Kit (Promega, Madison, WI) durchgeführt. Der Assay kann als Lumineszenz-Assay aufgefasst werden.^[185] Die Testungen wurden an den Proteinkinasen CLK1–4, DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3, CK1 und GSK3 α/β vom Kooperationspartner ManRos Therapeutics (Roscoff, Frankreich) durchgeführt. Der *in vitro* Enzymassay misst die Proteinkinaseaktivität durch die Quantifizierung der durch die Kinase-Reaktion produzierten Menge ADP. Das Volumen während jeglicher Messungen betrug 6 μ L. In diesen 6 μ L wurden die Proteinkinase, ein Substrat, ein Kinase-Puffer (Puffer A: 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 μ g/mL Heparin) und 10 μ M ATP für 30 min bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 6 μ L des ADP-GloTM-Reagenzes zugesetzt, was die

Kinasereaktion stoppte und unverbrauchtes ATP entfernte. Nach einer Inkubationszeit von 50 min bei Raumtemperatur wurden 12 µL eines Detektionsreagenzes zugesetzt und erneut für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transmission einer Luciferase-Reaktion wurde einem Mikroplatten-Luminometer (Envision, PerkinElmer, Waltham, MA) gemessen und als *Relative Light Unit* (RLU) angegeben. Die Peptid-Substrate wurden von Proteogenix (Schiltigheim, Frankreich) bezogen.

Verwendete Proteinkinasen des Kooperationspartners ManRos Therapeutics:

CLK1–4: Murine (*Mus musculus*), rekombinante und in Bakterien (*E. coli*) exprimierte CLK1–4 (MmCLK1–4) mit 0.027 µg/mL des Peptid-Substrates „GRSRSRSRSR“ im oben beschriebenen Puffer.

CK1δ/ε: Aus dem Gehirn von *Sus scrofa* isoliert (nativ) und mit Affinitätschromatographie aufgereinigt (SscCK1δ/ε) mit 0.022 µg/mL des Peptid-Substrates „RRKHAAIGS^pAYSITA“^a im oben beschriebenen Puffer. ^a Die Bezeichnung S^p steht für phosphoryliertes Serin.

DYRK1A/B, DYRK2, DYRK3: humane (*homo sapiens*), rekombinante und in Bakterien (*E. coli*) exprimierte DYRK1A/B, DYRK2 und DYRK3 (Hs_DYRK) mit 0.033 µg/mL des Peptid-Substrates „KKISGRLSPIMTEQ“ im oben beschriebenen Puffer. Der DNA-Vektor wurde von Dr. Walter Becker, Aachen, Deutschland zur Verfügung gestellt.

GSK3α/β: Beide Isoformen wurden aus dem Gehirn von *Sus scrofa* isoliert (nativ) und mit Affinitätschromatographie aufgereinigt (SscGSK3α/β) mit 0.010 µg/mL des GS-1-Peptids „YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQS^pEDEEE“^a im oben beschriebenen Puffer. ^a Die Bezeichnung S^p steht für phosphoryliertes Serin.

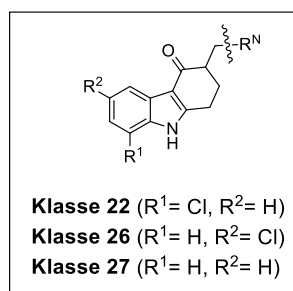
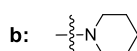
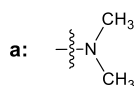
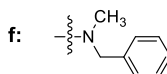
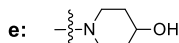
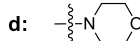
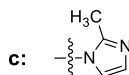
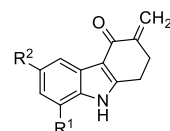
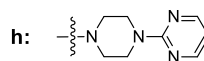
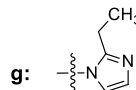
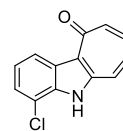
 $R^N =$  $R^N =$  $R^N =$ **29** ($R^1 = \text{Cl}$, $R^2 = \text{H}$)**30** ($R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Cl}$)**31** ($R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{H}$)**20**

Tabelle 8-1: Kinaseinhibitorische Aktivität, die durch ManRos Therapeutics für die angegebenen Verbindungen an den Proteinkinasen CLK4 und DYRK1A bestimmt wurde. ^a

#	CLK4	DYRK1A
22a · HCl	>10	>10
22b · HCl	>10	>10
22c · HCl	7,578	n. b.
22d · HCl	>10	>10
22f	>10	>10
27a	>10	>10
27b · HCl	>10	>10
27c	>10	>10
27d	>10	>10
27e	>10	>10
27f	>10	>10
27h	>10	>10
29	0,3158	1,736
30	>10	>10
31	>10	>10
32	>10	>10

^aDie Aktivität wurde als IC_{50} -Wert (μM) angegeben. Es wurde nur für Substanzen ein IC_{50} -Wert bestimmt, wenn dieser unter 10 μM lag. n. b.: nicht bestimmt.

Tabelle 8-2: Kinaseinhibitorische Aktivität, die durch ManRos Therapeutics für die angegebenen Verbindungen an den Proteinkinasen CLK1–4 und DYRK1A/B, DYRK2–3, CDK1 und GSK3 α/β bestimmt wurde. ^a

#	CLK1	CLK2	CLK3	CLK4	DYRK1A	DYRK1B	DYRK2	DYRK3	CK1	GSK3 α/β
20_1 μ M	19	32	77	23	43	53	40	71	106	105
20_10 μ M	1	9	73	3	10	27	17	51	40	57
22e_1 μ M	69	90	84	72	97	111	71	91	102	105
22e_10 μ M	25	45	83	35	78	82	62	76	103	100
22g_1 μ M	59	80	88	61	87	96	63	87	102	108
22g_10 μ M	13	33	87	20	64	81	47	63	101	107
26a-HCl_1 μ M	84	104	88	86	97	91	53	91	98	92
26a-HCl_10 μ M	87	106	90	90	94	98	52	78	109	106
26b_1 μ M	104	98	85	88	101	103	65	89	101	104
26b_10 μ M	87	103	87	89	90	88	48	68	90	95
26c_1 μ M	120	109	112	117	109	113	105	103	109	102
26c_10 μ M	120	106	123	117	101	95	124	99	88	98
26d_1 μ M	108	111	109	106	105	118	83	112	102	109
26d_10 μ M	118	104	110	114	107	105	99	97	95	85
26e_1 μ M	83	107	90	92	93	90	55	97	99	96
26e_10 μ M	95	106	91	88	96	106	60	76	97	100
26f_1 μ M	103	100	86	92	97	97	64	88	101	107
26f_10 μ M	100	109	106	98	101	105	77	107	95	83
27g_1 μ M	84	100	86	83	93	104	50	89	94	95
27g_10 μ M	75	101	88	83	89	88	54	82	108	111

^aDie Restaktivität an der entsprechenden Proteinkinase wurde angegeben (%). Die IC₅₀-Werte wurden nicht bestimmt.

8.5 Vorhergesagte physikochemische Eigenschaften

Der clogP-Wert wurde mit MarvinSketch ^[142] (Version 18.10) vorhergesagt. Die Vorhersage besteht aus der Kombination der Methoden von VISWANADHAN ^[139], KLOPMAN ^[186], CSIZMADIA ^[187] und der PHYSPROP®-Datenbank ^[188]. Alle weiteren physikochemischen Eigenschaften wurden mit SwissADME ^[143] bestimmt. Die verwendete SILICOS-IT-Methode, die in SwissADME implementiert ist, liegt den vorhergesagten clogS-Werten zugrunde, die in mol/L (cS) umgerechnet wurden. In dieser Methode werden einzelnen Atomen unterschiedliche Einflüsse auf die Löslichkeit zugeordnet, sodass eine Vorhersage anhand der Struktur möglich ist. Die Methode wurde als Vertreter der Vorhersageprogramme ausgewählt.

8.6 Löslichkeit

8.6.1 Kinetische Löslichkeit

Zur Bestimmung der kinetischen Löslichkeit wurde Nephelometrie verwendet. Vor den Experimenten wurde eine 96-*well-plate* zuerst leer vermessen und lediglich Felder (Kavitäten) mit einem NTU-Wert unterhalb von 10000 zur Vermessung verwendet. Drei Felder, die ebenfalls unter einem NTU-Wert von 1000 lagen, wurden für die Ermittlung von drei Blindwerten verwendet, die im Nachhinein von den Messwerten abgezogen wurden. Zunächst wurde eine Stammlösung der zu untersuchenden Verbindung in DMSO hergestellt. Durch Verdünnung dieser Stammlösung wurden Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Für jede Verbindung wurden zwei Verdünnungsreihen aus jeder Stammlösung hergestellt und vermessen. Je 5 µL dieser Stammlösungen wurde auf eine 96-*well*-Platte, die 195 µL eines natriumchloridhaltigen Phosphatpuffers pH 7.4 enthielt, pipettiert. Zur Herstellung des Puffers wurden Natriummonohydrogenphosphat-Dodecahydrat (238 mg, 6.65 mM), Kaliumdihydrogenphosphat (19 mg, 1.40 mM) und Natriumchlorid (800 mg, 137 mM) in bidest. Wasser (100 mL) gelöst. Zur genauen Einstellung des pH-Wertes auf 7.4 wurde Salzsäure (3 M) verwendet. Die DMSO-Konzentration in jedem einzelnen *well* betrug demnach 2.5%. Um die Ausgangskonzentration der Verdünnungsreihe zu erhalten, musste deshalb die höchste in der Messreihe bestimmte Konzentration mit dem Faktor 40 multipliziert werden. Nach der Probenvorbereitung wurde am Nephelometer bei einer Laserintensität von 40% gemessen. Sieben Sekunden vor der Messung wurde die Platte bei 700 rpm geschüttelt. Je nach Trübungsgrad der entsprechenden Konzentration kann eine unterschiedliche Intensität des Streulichtes gemessen werden. Zwischen der Intensität und Konzentration besteht bis zu einem gewissen Grad eine lineare Abhängigkeit.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit einem Excel-*template*. Durch Ermittlung des Schnittpunktes zweier Geraden unterhalb und oberhalb der kinetischen Löslichkeit kann die kinetische Löslichkeit ermittelt werden. Die resultierende *kickoff*-Kurve kann durch zwei Geraden beschrieben werden. Die erste Gerade wird durch Konzentrationen gebildet, bei denen keine bzw. sehr geringe Streulichtintensität gemessen wird. Hier entsteht eine Gerade, die parallel zur X-Achse verläuft. Der aufsteigende Teil der *kickoff*-Kurve wird durch eine linear ansteigende Streulichtintensität bei Konzentrationen mit steigendem NTU-Wert gebildet. Beide Geradengleichungen wurden durch die Einzelwerte rechnerisch ermittelt. Durch das Gleichsetzen beider Geradengleichungen wird der Schnittpunkt beider Geraden bestimmt. Dieser Schnittpunkt lieferte die kinetische Löslichkeit ($S_{\text{kin pH } 7.4}$). Für die Bestimmung von $S_{\text{kin pH } 7.4}$ sind für die Erstellung beider Geraden jeweils Werte oberhalb und unterhalb des Schnittpunkts notwendig. In einigen Fällen mussten daher weitere Konzentrationen vermessen werden. Bei einer zu hohen kinetischen Löslichkeit konnte eine kinetische Löslichkeit nur ungenau bestimmt werden, da eine Stammlösung für die entsprechenden Verdünnungen nicht herzustellen war. Für die sehr gut lösliche Verbindung **22b** · HCl konnten lediglich Konzentrationen vermessen werden, bei denen die NTU-Werte unter 10000 lagen. Daher wurde die kinetische Löslichkeit oberhalb der maximal vermessenen Konzentration angegeben. Von jeder Verbindung, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, wurden zwei Verdünnungsreihen aus einer Einwaage vermessen. Werte die als Orientierung dienten und keinen Einfluss auf die Gerade unterhalb der Löslichkeitsgrenze hatten sowie Werte die einen Sättigungseffekt zeigten wurden nicht im Excel-*template* berücksichtigt. Durch eine Berücksichtigung der Sättigungswerte resultierte ein Schnittpunkt im negativen Bereich, der als unrealistisch eingestuft wurde. Einzelne Werte, die stark von der Tendenz abwichen, wurden in einer zusätzlichen Verdünnung erneut vermessen und ggf. durch den neuen Wert ersetzt.

8.6.2 Thermodynamische Löslichkeit

Die thermodynamische Löslichkeit wurde mit einer etablierten *shake flask*-Methode bestimmt.^[182] Auch für die thermodynamische Löslichkeit wurde der in Kapitel 8.6.1 beschriebene natriumchloridhaltige Phosphatpuffer pH 7.4 verwendet. Zur Bestimmung der thermodynamischen Löslichkeit wurden zwei unabhängige Messungen für 24 und 48 h durchgeführt. In ein Whatman MiniUniPrep Vial (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) wurde zunächst eine Spatelspitze (ca. 500–1000 µg) der Testsubstanz gegeben. Anschließend wurden 300 µL des Phosphatpuffers zugesetzt. War nach Zugabe des Puffers kein Bodensatz mehr erkennbar, wurde weiter Testsubstanz in kleinen Portionen zugesetzt. Nach visueller Kontrolle des Bodensatzes wurden die Vials mit dem beiliegenden Filteraufsatz reversibel verschlossen. Um Verluste durch Verdunstung zu verhindern, wurden die Vials mit einem

Labor-Film (Parafilm M, Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA) umhüllt. Beide unabhängigen Proben wurden nun für 24 oder 48 h auf dem Schüttelinkubator bei 25 °C und 400 rpm inkubiert. Vor der Vermessung wurde ein weiteres Mal auf das Vorhandensein eines Bodensatzes geachtet. Der Bodensatz wurde dann durch den im Filteraufsatz integrierten Filter abfiltriert.

Für die Quantifizierung der einzelnen Proben wurde eine HPLC-Methode verwendet. Die isokratischen Fließmittelgemische können den experimentellen Daten entnommen werden. Zur Auswertung wurde eine extern erstellte Kalibriergerade verwendet, die durch Verdünnung einer 10 mM Stammlösung der einzelnen Verbindungen in DMSO generiert wurde. Für jede Verbindung wurden drei verschiedene Konzentrationen vermessen. Die Auswertungswellenlängen lagen bei 254 und 280 nm. Nach Auftragung der AUC gegen die Konzentration wurde rechnerisch für jede Wellenlänge eine Kalibriergeradengleichung erhalten, die für die unterschiedlichen Proben die thermodynamische Löslichkeit lieferte. Nach 48 h wurde stets eine ähnliche Konzentration bestimmt, sodass eine weitere Messung nach 72 h entfiel. Konnte keine oder nur eine sehr geringe Absorption der Proben festgestellt werden, wurde die thermodynamische Löslichkeit mit $< 5 \mu\text{M}$ angegeben, da dies die kleinste Konzentration darstellte, die während der Kalibrierung vermessen wurde. In einigen Fällen konnte auch eine Kalibrierung unterhalb dieser Grenze durchgeführt werden, sodass die thermodynamische Löslichkeit genauer bestimmt werden konnte. Die Angabe der thermodynamischen Löslichkeit bezieht sich auf die Messung nach 24 h bei einer Auswertungswellenlänge von 254 nm. Die beiden erhaltenen Werte der unabhängigen Messungen wurden gemittelt und die Spannweite mit angegeben.

9 Verzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Co-Kristallstruktur der Proteinkinase DYRK1A mit Bezeichnung charakteristischer Merkmale	5
Abbildung 1-2: Nahansicht der katalytischen Domäne von DYRK1A mit dem Liganden 10-Iod-11H-indol[3,2-c]chinolin-6-carbonsäure	6
Abbildung 1-3: Strukturen der Inhibitoren Harmin (1), AnnH75 (2) und Verbindung 3	9
Abbildung 1-4: Struktur des Flavanols ECGC (4)	10
Abbildung 1-5: Struktur der Meridianin-Derivate 5 und 6	10
Abbildung 1-6: Struktur der Leucettamine 7 und 8	11
Abbildung 1-7: Struktur der Benzothiazole TC003 (9), INDY (10) und proINDY (11).	11
Abbildung 1-8: Struktur der bisher potentesten DYRK1A-Inhibitoren EHT 1610 (12) und EHT 5372 (13)	12
Abbildung 1-9: Struktur von DANDY 14 und FDANDY 15	13
Abbildung 1-10: Struktur von CX_4945 (16)	13
Abbildung 1-11: Struktur von FINDY (17)	14
Abbildung 1-12: Vergleich der Oberflächenstruktur der ATP-Bindetasche von DYRK1A und CLK1 durch Superimposition	17
Abbildung 1-13: Co-Kristallstruktur von 18 in der humanen CDK2 mit drei Arten von Halogenbindungen.	20
Abbildung 1-14: Co-Kristallstruktur von 2-(3-Bromphenyl)-6-[(2-hydroxyethyl)amino]-1H-benz[de]-isochinolin-1,3-(2H)-dion in der Hepatitis C Polymerase NS5B Genotyp B	21
Abbildung 1-15: Aufstellung der physikochemischen Eigenschaften von 19	27
Abbildung 1-16: Aufstellung der physikochemischen Eigenschaften von 20 und 21	28
Abbildung 1-17: Aufstellung der physikochemischen Eigenschaften von 22	29
Abbildung 1-18: Rolitetrazyklin (23) und Tetrazyklin (24)	30
Abbildung 2-1: Lage von Harmin in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	33
Abbildung 2-2: Ausschnitt der ATP-Bindetasche von DYRK1A zur detaillierten Darstellung des Bindungsmodus von Harmin	33
Abbildung 2-3: Lage von XMD7-117 in der ATP-Bindetasche von DYRK1A.	34
Abbildung 2-4: Detaillierte Darstellung der Interaktionen des Azaindol-Grundgerüsts von XMD7-117	34
Abbildung 2-5: Lage von 19 in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	35
Abbildung 2-6: Detaillierte Darstellung der möglichen wasservermittelten Bindung zwischen 19 und Leu241 der <i>hinge</i> -Region	35
Abbildung 2-7: Lage von 20 in der ATP-Bindetasche von DYRK1A in einer nicht publizierten Co-Kristallstruktur	36
Abbildung 2-8: Detaillierte Darstellung einer möglichen Halogenbindung zwischen dem Chlor-Substituenten von 20 und Leu241 der <i>hinge</i> -Region von DYRK1A	36
Abbildung 2-9A/B: Visualisierung der <i>redocking</i> -Posen, die den höchsten ChemScore aufwiesen	38

Abbildung 2-10: Darstellung beider Stereoisomere von Verbindung (<i>R/S</i>)- 22a mit der Zuweisung von Lokanten	39
Abbildung 2-11: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten mit der Ausgangs-verbindung 21 in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	40
Abbildung 2-12: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten mit (<i>S</i>)- 22a in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	41
Abbildung 2-13: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten mit (<i>R</i>)- 22 in der katalytischen Domäne von DYRK1A	42
Abbildung 2-14: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten mit (<i>S</i>)- 22 in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	43
Abbildung 2-15: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten mit (<i>R</i>)- 22b in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	44
Abbildung 2-16: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten (<i>S</i>)- 22c in der ATP-Binde-tasche von DYRK1A	45
Abbildung 2-17: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten (<i>R</i>)- 26a in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	47
Abbildung 2-18: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten (<i>R</i>)- 26b in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	48
Abbildung 2-19: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten (<i>S</i>)- 26c in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	49
Abbildung 2-20: Detaillierte Darstellung der <i>docking</i> -Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A mit (<i>R</i>)- 27a (grau)	50
Abbildung 2-21: Detaillierte Darstellung der <i>docking</i> -Ergebnisse in der ATP-Bindetasche von DYRK1A mit (<i>S</i>)- 27a	51
Abbildung 2-22: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten mit 28 in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	52
Abbildung 2-23: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten mit 29 in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	53
Abbildung 2-24: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten mit 29 in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	54
Abbildung 2-25: Struktur der Verbindung 31	54
Abbildung 2-26: Bindemodi von (<i>R</i>)- 32 und (<i>S</i>)- 32 in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	55
Abbildung 2-27: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten mit (<i>S</i>)- 22e in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	56
Abbildung 2-28: A) Bindungsmodus von 21 in der ATP-Bindetasche des Homologie-Modells von LinDYRK1	59
Abbildung 3-1: Reaktionskontrolle zur Synthese der Verbindung 31	65
Abbildung 3-2: Reaktionskontrolle zur Synthese der Verbindung 29	65
Abbildung 3-3: APCI-Vermessung der Verbindung 27a im positiven Modus	70
Abbildung 3-4: ESI-Vermessung der Verbindung 27a im positiven Modus	71
Abbildung 3-5: ¹ H-NMR-Spektrum des Hydrochlorids von Verbindung 27a	72
Abbildung 3-6: ¹³ C-NMR-Spektrum des Hydrochlorids von Verbindung 27a	73

Abbildung 3-7: 2D-HSQC-Experiment des Hydrochlorids von Verbindung 27a	73
Abbildung 3-8: Detaillierte Darstellung des ^1H -NMR-Signals für die Methylgruppen am N'-Stickstoff von 27a · HCl	74
Abbildung 3-9: Superimposition der ^{13}C -NMR-Spektren von 27a als freie Base und als Hydrochlorid	75
Abbildung 4-1: Ergebnisse aus <i>docking</i> -Experimenten mit 29 und 30 in der ATP-Bindetasche von DYRK1A	79
Abbildung 4-2: Darstellung der energieärmsten Konformation von 27a · Hcl und 26b	82
Abbildung 5-1: Bestimmung der kinetischen Löslichkeit von Verbindung 27f mittels Nephelometrie	91

9.2 Formelverzeichnis

Formel 1-1: Berechnung des F_{sp^3} -Verhältnisses	24
Formel 1-2: Yalkowsky-Gleichung zur Abschätzung der Wasserlöslichkeit.	25
Formel 1-3: Berechnung des LE-Wertes nach Hopkins	26
Formel 1-4: Berechnung des LLE-Wertes nach Hopkins	26

9.3 Schemataverzeichnis

Schema 3-1: Zweistufige Darstellung von Verbindung 21	60
Schema 3-2: Darstellung von 21 nach Falke	61
Schema 3-3: Darstellung von 28	61
Schema 3-4: Versuche zur Darstellung von 22a	62
Schema 3-5: Darstellung des 3-Methylen-carbazol-4-ons 31 aus 33 .	63
Schema 3-6: Darstellung von 42 nach Kim	64
Schema 3-7: Darstellung der Verbindungen 29 , 30 und 31	66
Schema 3-8: Postulierter Additions-Eliminierungs-Reaktionsmechanismus zur Darstellung der Verbindungen 29 , 30 und 31	67
Schema 3-9: Darstellung der Mannich-Basen der Klasse 22 , 26 und 27	68
Schema 3-10: Strukturen der Mannich-Basen aus den Klasse 22 , 26 und 27	69
Schema 3-11: Synthese von Verbindung 32	69
Schema 3-12: Schematische Darstellung möglicher Fragmente, die während der APCI-Messung im positiven Modus entstanden sein können	71
Schema 5-1: Darstellung der Strukturen, deren physikochemische Eigenschaften im Verlauf dieser Arbeit untersucht wurden	84

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Vergleich der katalytischen Domänen von DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4, CLK1 und GSK3- β	16
Tabelle 1-2: Vergleich der katalytischen Domänen von DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4, CLK1 und GSK3- β . Fortsetzung von Tabelle 1-1	16
Tabelle 1-3: Prozentuale Identität der Protein-Sequenzen von DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4, CLK1 und GSK3- β in Bezug auf DYRK1A	16
Tabelle 1-4: Aufstellung wichtiger van-der-Waals <i>radii</i> (Å) für die Bestimmung der optimalen Entfernung zweier Halogenbindungspartner	19
Tabelle 1-5: <i>Biopharmaceutical Classification System</i> (BCS): Einteilung der vier Klassen mit Beispielen aus der Literatur	24
Tabelle 4-1: Inhibitorische Aktivitäten (IC ₅₀ -Werte) von 19–21 an DYRK1A/1B und CLK1/4	77
Tabelle 4-2: Inhibitorische Aktivität der Verbindungen 29, 30 und 31	78
Tabelle 4-3: Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der synthetisierten Mannich-Basen der Klassen 22, 26 und 27 und Verbindung 32 an ausgewählten Proteinkinasen	80
Tabelle 5-1: Vorhergesagte physikochemische Eigenschaften und experimentell bestimmte Schmelzpunkte für die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Verbindungen	85
Tabelle 5-2: Vorhergesagte physikochemische Eigenschaften und experimentell bestimmte Schmelzpunkte für die 3-Methylen-Verbindungen 29–31	87
Tabelle 5-3: Vergleich der physikochemischen Eigenschaften von 19 und 20	92
Tabelle 5-4: Vergleich der physikochemischen Eigenschaften von 29, 30 und 31	93
Tabelle 5-5: Vergleich der physikochemischen Eigenschaften von 22b · HCl, 26b und 27b · HCl	95
Tabelle 5-6: Vergleich der physikochemischen Eigenschaften von 22f, 26f und 27f	96
Tabelle 5-7: Vergleich der physikochemischen Eigenschaften der freien Basen und den Hydrochloriden der Verbindungen 27f und 42 (Dihydrat)	98
Tabelle 5-8: Vergleich des Einflusses unterschiedlicher basischer Seitenketten bei Verbindungen der Klasse 26 auf die physikochemischen Eigenschaften	100
Tabelle 5-9: Vergleich der physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Hydrochloride	102
Tabelle 8-1: Kinaseinhibitorische Aktivität, die durch ManRos Therapeutics für die angegebenen Verbindungen an den Proteinkinasen CLK4 und DYRK1A bestimmt wurden	146
Tabelle 8-2: Kinaseinhibitorische Aktivität, die durch ManRos Therapeutics für die angegebenen Verbindungen an den Proteinkinasen CLK1–4 und DYRK1A/B, DYRK2–3, CDK1 und GSK3 α/β bestimmt wurden	147

10 Literaturverzeichnis

- [1] Wang, J.; Gu, B. J.; Masters, C. L.; Wang, Y.-J.: A systemic view of Alzheimer disease – insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nat. Rev. Neurol.* **2017**, 13, 612–623.
- [2] Editorial: Dementia burden coming into focus. *Lancet* **2017**, 390, S. 2606.
- [3] Lao, K.; Ji, N.; Zhang, X.; Qiao, W.; Tang, Z.; Gou, X.: Drug development for Alzheimer's disease: review. *J. Drug Targeting* **2018**, 27, 164–173.
- [4] Blennow, K.; Leon, M. J. de; Zetterberg, H.: Alzheimer's disease. *Lancet* **2006**, 368, 387–403.
- [5] Burns, A.; Iliffe, S.: Alzheimer's disease. *Br. Med. J.* **2009**, 338, 467–471, b158.
- [6] Reitz, C.; Mayeux, R.: Alzheimer disease. Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, 88, 640–651.
- [7] Kametani, F.; Hasegawa, M.: Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* **2018**, 12, 25.
- [8] Kadavath, H.; Hofele, R. V.; Biernat, J.; Kumar, S.; Tepper, K.; Urlaub, H.; Mandelkow, E.; Zweckstetter, M.: Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, 112, 7501–7506.
- [9] Kása, P.; Rakonczay, Z.; Gulya, K.: The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **1997**, 52, 511–535.
- [10] Matsunaga, S.; Kishi, T.; Nomura, I.; Sakuma, K.; Okuya, M.; Ikuta, T.; Iwata, N.: The efficacy and safety of memantine for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Drug Saf.* **2018**, 17, 1053–1061.
- [11] Birks, J. S.; Harvey, R. J.: Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, 6, Artikel CD001190.
- [12] Stahl, S. M.: The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, Part 1. *J. Clin. Psychiatry.* **2000**, 61, 710–711.
- [13] Kishi, T.; Matsunaga, S.; Oya, K.; Nomura, I.; Ikuta, T.; Iwata, N.: Memantine for Alzheimer's disease. An updated systematic review and meta-analysis. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, 60, 401–425.
- [14] Kennedy, M. E.; Stamford, A. W.; Chen, X.; Cox, K.; Cumming, J. N.; Dockendorf, M. F.; Egan, M.; Ereshefsky, L.; Hodgson, R. A.; Hyde, L. A.; Jhee, S.; Kleijn, H. J.; Kuvelkar, R.; Li, W.; Mattson, B. A.; Mei, H.; Palcza, J.; Scott, J. D.; Tanen, M.; Troyer, M. D.; Tseng, J. L.; Stone, J. A.; Parker, E. M.; Forman, M. S.: The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS β -amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients. *Sci. Transl. Med.* **2016**, 8, 363ra150.

- [15] Eketjäll, S.; Janson, J.; Kaspersson, K.; Bogstedt, A.; Jeppsson, F.; Fälting, J.; Budd Haeberlein, S.; Kugler, A. R.; Alexander, R. C.; Cebers, G.: AZD3293. A novel, orally active BACE1 inhibitor with high potency and permeability and markedly slow off-rate kinetics. *J. Alzheimer's Dis.* **2016**, *50*, 1109–1123.
- [16] Domínguez, J. M.; Fuertes, A.; Orozco, L.; Monte-Millán, M. del; Delgado, E.; Medina, M.: Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by tideglusib. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 893–904.
- [17] Lovestone, S.; Boada, M.; Dubois, B.; Hüll, M.; Rinne, J. O.; Huppertz, H.-J.; Calero, M.; Andrés, M. V.; Gómez-Carrillo, B.; León, T.; Ser, T. d.: A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2015**, *45*, 75–88.
- [18] Antonarakis, S. E.: Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance. *Nat. Rev. Genet.* **2017**, *18*, 147–163.
- [19] Coppedè, F.: Risk factors for Down syndrome. *Arch. Toxicol.* **2016**, *90*, 2917–2929.
- [20] Karmiloff-Smith, A.; Al-Janabi, T.; D'Souza, H.; Groet, J.; Massand, E.; Mok, K.; Startin, C.; Fisher, E.; Hardy, J.; Nizetic, D.; Tybulewicz, V.; Strydom, A.: The importance of understanding individual differences in Down syndrome. *F1000 Fac. Rev.* **2016**, *5*, 389.
- [21] Hartley, D.; Blumenthal, T.; Carrillo, M.; DiPaolo, G.; Esralew, L.; Gardiner, K.; Granholm, A.-C.; Iqbal, K.; Krams, M.; Lemere, C.; Lott, I.; Mobley, W.; Ness, S.; Nixon, R.; Potter, H.; Reeves, R.; Sabbagh, M.; Silverman, W.; Tycko, B.; Whitten, M.; Wisniewski, T.: Down syndrome and Alzheimer's disease. Common pathways, common goals. *Alzheimer's Dementia* **2015**, *11*, 700–709.
- [22] Rask-Andersen, M.; Zhang, J.; Fabbro, D.; Schiöth, H. B.: Advances in kinase targeting. Current clinical use and clinical trials. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 604–620.
- [23] Johnson, L. N.; Lewis, R. J.: Structural basis for control by phosphorylation. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2209–2242.
- [24] Adams, J. A.: Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2271–2290.
- [25] Seifert, A.; Allan, L. A.; Clarke, P. R.: DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *FEBS J.* **2008**, *275*, 6268–6280.
- [26] Laguna, A.; Aranda, S.; Barallobre, M. J.; Barhoum, R.; Fernández, E.; Fotaki, V.; Delabar, J. M.; La Luna, S. de; La Villa, P. de; Arbonés, M. L.: The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development. *Dev. Cell.* **2008**, *15*, 841–853.
- [27] Becker, W.: Emerging role of DYRK family protein kinases as regulators of protein stability in cell cycle control. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 3389–3394.
- [28] Nguyen, L.; Besson, A.; Ik-Tsen Heng, J.; Schuurmans, C.; Teboul, L.; Parras, C.; Philpott, A.; Roberts, J. M.; Guillemot, F.: p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1511–1524.

- [29] Park, J.; Oh, Y.; Yoo, L.; Jung, M.-S.; Song, W.-J.; Lee, S.-H.; Seo, H.; Chung, K. C.: Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31895–31906.
- [30] Kim, M.-Y.; Jeong, B. C.; Lee, J. H.; Kee, H. J.; Kook, H.; Kim, N. S.; Kim, Y. H.; Kim, J.-K.; Ahn, K. Y.; Kim, K. K.: A repressor complex, AP4 transcription factor and geminin, negatively regulates expression of target genes in nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13074–13079.
- [31] Shi, J.; Zhang, T.; Zhou, C.; Chohan, M. O.; Gu, X.; Wegiel, J.; Zhou, J.; Hwang, Y.-W.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Gong, C.-X.; Liu, F.: Increased dosage of Dyrk1A alters alternative splicing factor (ASF)-regulated alternative splicing of tau in Down syndrome. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 28660–28669.
- [32] Grau, C.; Arató, K.; Fernández-Fernández, J. M.; Valderrama, A.; Sindreu, C.; Fillat, C.; Ferrer, I.; La Luna, S. de; Altafaj, X.: DYRK1A-mediated phosphorylation of GluN2A at Ser¹⁰⁴⁸ regulates the surface expression and channel activity of GluN1/GluN2A receptors. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*, 331.
- [33] Aranda, S.; Laguna, A.; La Luna, S. de: DYRK family of protein kinases. Evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J.* **2011**, *25*, 449–462.
- [34] Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S.: The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, *298*, 1912–1934.
- [35] Esvan, Y. J.; Zeinyeh, W.; Boibessot, T.; Nauton, L.; Théry, V.; Knapp, S.; Chaikuad, A.; Loaëc, N.; Meijer, L.; Anizon, F.; Giraud, F.; Moreau, P.: Discovery of pyrido[3,4-g]quinazoline derivatives as CMGC family protein kinase inhibitors. Design, synthesis, inhibitory potency and X-ray co-crystal structure. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *118*, 170–177.
- [36] Soundararajan, M.; Roos, A. K.; Savitsky, P.; Filippakopoulos, P.; Kettenbach, A. N.; Olsen, J. V.; Gerber, S. A.; Eswaran, J.; Knapp, S.; Elkins, J. M.: Structures of Down syndrome kinases, DYRKs, reveal mechanisms of kinase activation and substrate recognition. *Structure* **2013**, *21*, 986–996.
- [37] Sakkiah, S.; Cao, G. P.; Gupta, S. P.; Lee, K. W.: Overview of the structure and function of protein kinases. *Curr. Enzyme Inhib.* **2017**, *13*, 81–88.
- [38] Astolfi, A.; Iraci, N.; Sabatini, S.; Barreca, M. L.; Cecchetti, V.: p38 α MAPK and type I inhibitors. Binding site analysis and use of target ensembles in virtual screening. *Molecules* **2015**, *20*, 15842–15861.
- [39] Engh, R. A.; Bossemeyer, D.: Structural aspects of protein kinase control—role of conformational flexibility. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *93*, 99–111.
- [40] Treiber, D. K.; Shah, N. P.: Ins and outs of kinase DFG motifs. *Cell Chem. Biol.* **2013**, *20*, 745–746.

- [41] Vijayan, R. S. K.; He, P.; Modi, V.; Duong-Ly, K. C.; Ma, H.; Peterson, J. R.; Dunbrack, R. L.; Levy, R. M.: Conformational analysis of the DFG-out kinase motif and biochemical profiling of structurally validated type II inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 466–479.
- [42] Hanks, S. K.; Hunter, T.: Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **1995**, *9*, 576–596.
- [43] Kornev, A. P.; Haste, N. M.; Taylor, S. S.; Eyck, L. F. T.: Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 17783–17788.
- [44] Becker, W.; Joost, H. G.: Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1999**, *62*, 1–17.
- [45] Park, J.; Song, W.-J.; Chung, K. C.: Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 3235–3240.
- [46] Kentrup, H.; Becker, W.; Heukelbach, J.; Wilmes, A.; Schürmann, A.; Huppertz, C.; Kainulainen, H.; Joost, H.-G.: Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3488–3495.
- [47] Becker, W.; Sippl, W.: Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS J.* **2011**, *278*, 246–256.
- [48] Adayev, T.; Chen-Hwang, M.-C.; Murakami, N.; Lee, E.; Bolton, D. C.; Hwang, Y.-W.: Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A does not require tyrosine phosphorylation for activity in vitro. *Biochemistry* **2007**, *46*, 7614–7624.
- [49] Kannan, N.; Neuwald, A. F.: Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2 α . *Protein Sci.* **2004**, *13*, 2059–2077.
- [50] Falke, H.; Chaikuad, A.; Becker, A.; Loaec, N.; Lozach, O.; Abu Jhaisha, S.; Becker, W.; Jones, P. G.; Preu, L.; Baumann, K.; Knapp, S.; Meijer, L.; Kunick, C.: 10-Iodo-11*H*-indolo[3,2-*c*] quinoline-6-carboxylic acids are selective inhibitors of DYRK1A. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3131–3143.
- [51] Gwack, Y.; Sharma, S.; Nardone, J.; Tanasa, B.; Iuga, A.; Srikanth, S.; Okamura, H.; Bolton, D.; Feske, S.; Hogan, P. G.; Rao, A.: A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* **2006**, *441*, 646–650.
- [52] Belgardt, B.-F.; Lammert, E.: DYRK1A: A promising drug target for islet transplant-based diabetes therapies. *Diabetes* **2016**, *65*, 1496–1498.
- [53] Dirice, E.; Walpita, D.; Vetere, A.; Meier, B. C.; Kahraman, S.; Hu, J.; Dančik, V.; Burns, S. M.; Gilbert, T. J.; Olson, D. E.; Clemons, P. A.; Kulkarni, R. N.; Wagner, B. K.: Inhibition of DYRK1A stimulates human β -cell proliferation. *Diabetes* **2016**, *65*, 1660–1671.

- [54] Shen, W.; Taylor, B.; Jin, Q.; Ngyuen-Tran, V.; Meeusen, S.; Zhang, Y.-Q.; Kamireddy, A.; Swafford, A.; Powers, A. F.; Walker, J.; Lamb, J.; Bursalaya, B.; DiDonato, M.; Harb, G.; Qiu, M.; Filippi, C. M.; Deaton, L.; Turk, C. N.; Suarez-Pinzon, W. L.; Liu, Y.; Hao, X.; Mo, T.; Yan, S.; Li, J.; Herman, A. E.; Hering, B. J.; Wu, T.; Seidel, H. M.; McNamara, P.; Glynn, R.; Laffitte, B.: Inhibition of DYRK1A and GSK3B induces human β -cell proliferation. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8372.
- [55] Soppa, U.; Schumacher, J.; Florencio Ortiz, V.; Pasqualon, T.; Tejedor, F. J.; Becker, W.: The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27^{Kip1} and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle* **2014**, *13*, 2084–2100.
- [56] Sadasivam, S.; DeCaprio, J. A.: The DREAM complex. Master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 585–595.
- [57] Fernandez-Martinez, J.; Vela, E. M.; Tora-Ponsioen, M.; Ocaña, O. H.; Nieto, M. A.; Galceran, J.: Attenuation of Notch signalling by the Down-syndrome-associated kinase DYRK1A. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 1574–1583.
- [58] Abbassi, R.; Johns, T. G.; Kassiou, M.; Munoz, L.: DYRK1A in neurodegeneration and cancer: Molecular basis and clinical implications. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *151*, 87–98.
- [59] Seifert, A.; Allan, L. A.; Clarke, P. R.: DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *FEBS J.* **2008**, *275*, 6268–6280.
- [60] Guo, X.; Williams, J. G.; Schug, T. T.; Li, X.: DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 13223–13232.
- [61] Ryoo, S.-R.; Jeong, H. K.; Radnaabazar, C.; Yoo, J.-J.; Cho, H.-J.; Lee, H.-W.; Kim, I.-S.; Cheon, Y.-H.; Ahn, Y. S.; Chung, S.-H.; Song, W.-J.: DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 34850–34857.
- [62] Qian, W.; Jin, N.; Shi, J.; Yin, X.; Jin, X.; Wang, S.; Cao, M.; Iqbal, K.; Gong, C.-X.; Liu, F.: Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A) enhances tau expression. *J. Alzheimer's Dis.* **2013**, *37*, 529–538.
- [63] Baek, K.-H.; Zaslavsky, A.; Lynch, R. C.; Britt, C.; Okada, Y.; Siarey, R. J.; Lensch, M. W.; Park, I.-H.; Yoon, S. S.; Minami, T.; Korenberg, J. R.; Folkman, J.; Daley, G. Q.; Aird, W. C.; Galdzicki, Z.; Ryeom, S.: Down syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* **2009**, *459*, 1126–1130.
- [64] Aranda, S.; Alvarez, M.; Turró, S.; Laguna, A.; La Luna, S. de: Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 5899–5911.
- [65] Kim, H. J.; Taylor, L. J.; Bar-Sagi, D.: Spatial regulation of EGFR signaling by Sprouty2. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 455–461.

- [66] Malinge, S.; Bliss-Moreau, M.; Kirsammer, G.; Diebold, L.; Chlon, T.; Gurbuxani, S.; Crispino, J. D.: Increased dosage of the chromosome 21 ortholog *Dyrk1a* promotes megakaryoblastic leukemia in a murine model of Down syndrome. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 948–962.
- [67] Pozo, N.; Zahonero, C.; Fernández, P.; Liñares, J. M.; Ayuso, A.; Hagiwara, M.; Pérez, A.; Ricoy, J. R.; Hernández-Lain, A.; Sepúlveda, J. M.; Sánchez-Gómez, P.: Inhibition of DYRK1A destabilizes EGFR and reduces EGFR-dependent glioblastoma growth. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 2475–2487.
- [68] Shi, J.; Zhang, T.; Zhou, C.; Chohan, M. O.; Gu, X.; Wegiel, J.; Zhou, J.; Hwang, Y.-W.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Gong, C.-X.; Liu, F.: Increased dosage of Dyrk1A alters alternative splicing factor (ASF)-regulated alternative splicing of tau in Down syndrome. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 28660–28669.
- [69] Contestabile, A.; Fila, T.; Ceccarelli, C.; Bonasoni, P.; Bonapace, L.; Santini, D.; Bartesaghi, R.; Ciani, E.: Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with Down syndrome and in Ts65Dn mice. *Hippocampus* **2007**, *17*, 665–678.
- [70] Smith, B.; Medda, F.; Gokhale, V.; Dunckley, T.; Hulme, C.: Recent advances in the design, synthesis, and biological evaluation of selective DYRK1A inhibitors. A new avenue for a disease modifying treatment of Alzheimer's? *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 857–872.
- [71] Ryu, Y. S.; Park, S. Y.; Jung, M.-S.; Yoon, S.-H.; Kwen, M.-Y.; Lee, S.-Y.; Choi, S.-H.; Radnaabazar, C.; Kim, M.-K.; Kim, H.; Kim, K.; Song, W.-J.; Chung, S.-H.: Dyrk1A-mediated phosphorylation of Presenilin 1: a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2010**, *115*, 574–584.
- [72] Kimura, R.; Kamino, K.; Yamamoto, M.; Nuripa, A.; Kida, T.; Kazui, H.; Hashimoto, R.; Tanaka, T.; Kudo, T.; Yamagata, H.; Tabara, Y.; Miki, T.; Akatsu, H.; Kosaka, K.; Funakoshi, E.; Nishitomi, K.; Sakaguchi, G.; Kato, A.; Hattori, H.; Uema, T.; Takeda, M.: The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 15–23.
- [73] Widowati, E. W.; Ernst, S.; Hausmann, R.; Müller-Newen, G.; Becker, W.: Functional characterization of DYRK1A missense variants associated with a syndromic form of intellectual deficiency and autism. *Biol. Open* **2018**, *7*, bio032862.

- [74] Arrowsmith, C. H.; Audia, J. E.; Austin, C.; Baell, J.; Bennett, J.; Blagg, J.; Bountra, C.; Brennan, P. E.; Brown, P. J.; Bunnage, M. E.; Buser-Doepner, C.; Campbell, R. M.; Carter, A. J.; Cohen, P.; Copeland, R. A.; Cravatt, B.; Dahlin, J. L.; Dhanak, D.; Edwards, A. M.; Frederiksen, M.; Frye, S. V.; Gray, N.; Grimshaw, C. E.; Hepworth, D.; Howe, T.; Huber, K. V. M.; Jin, J.; Knapp, S.; Kotz, J. D.; Kruger, R. G.; Lowe, D.; Mader, M. M.; Marsden, B.; Mueller-Fahrnow, A.; Müller, S.; O'Hagan, R. C.; Overington, J. P.; Owen, D. R.; Rosenberg, S. H.; Ross, R.; Roth, B.; Schapira, M.; Schreiber, S. L.; Shoichet, B.; Sundström, M.; Superti-Furga, G.; Taunton, J.; Toledo-Sherman, L.; Walpole, C.; Walters, M. A.; Willson, T. M.; Workman, P.; Young, R. N.; Zuercher, W. J.: The promise and peril of chemical probes. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 536–541.
- [75] Oprea, T. I.; Bologa, C. G.; Boyer, S.; Curpan, R. F.; Glen, R. C.; Hopkins, A. L.; Lipinski, C. A.; Marshall, G. R.; Martin, Y. C.; Ostopovici-Halip, L.; Rishton, G.; Ursu, O.; Vaz, R. J.; Waller, C.; Waldmann, H.; Sklar, L. A.: A crowdsourcing evaluation of the NIH chemical probes. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 441–447.
- [76] Garbaccio, R. M.; Parmee, E. R.: The impact of chemical probes in drug discovery: a pharmaceutical industry perspective. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 10–17.
- [77] Davis, M. I.; Hunt, J. P.; Herrgard, S.; Ciceri, P.; Wodicka, L. M.; Pallares, G.; Hocker, M.; Treiber, D. K.; Zarrinkar, P. P.: Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 1046–1051.
- [78] Grabher, P.; Durieu, E.; Kouloura, E.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, L. A.; Meijer, L.; Hamburger, M.; Potterat, O.: Library-based discovery of DYRK1A/CLK1 inhibitors from natural product extracts. *Planta Med.* **2012**, *78*, 951–956.
- [79] Becker, W.; Soppa, U.; Tejedor, F.: DYRK1A: a potential drug target for multiple Down syndrome neuropathologies. *CNS Neurol. Disord.: Drug Targets* **2014**, *13*, 26–33.
- [80] Nguyen, T. L.; Fruit, C.; Hérault, Y.; Meijer, L.; Besson, T.: Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) inhibitors: a survey of recent patent literature. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, *27*, 1183–1199.
- [81] Stotani, S.; Giordanetto, F.; Medda, F.: DYRK1A inhibition as potential treatment for Alzheimer's disease. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 681–696.
- [82] Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C. J.; McLauchlan, H.; Klevernic, I.; Arthur, J. S. C.; Alessi, D. R.; Cohen, P.: The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* **2007**, *408*, 297–315.
- [83] Göckler, N.; Jofre, G.; Papadopoulos, C.; Soppa, U.; Tejedor, F. J.; Becker, W.: Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6324–6337.
- [84] Kim, H.; Sablin, S. O.; Ramsay, R. R.: Inhibition of monoamine oxidase A by beta-carboline derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *337*, 137–142.

- [85] Kumar, K.; Wang, P.; Sanchez, R.; Swartz, E. A.; Stewart, A. F.; DeVita, R. J.: Development of kinase-selective, harmine-based DYRK1A inhibitors that induce pancreatic human β -cell proliferation. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 7687–7699.
- [86] Sonamoto, R.; Kii, I.; Koike, Y.; Sumida, Y.; Kato-Sumida, T.; Okuno, Y.; Hosoya, T.; Hagiwara, M.: Identification of a DYRK1A inhibitor that induces degradation of the target kinase using co-chaperone CDC₃₇ fused with luciferase nanoKAZ. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12728.
- [87] Rüben, K.; Wurzlbauer, A.; Walte, A.; Sippl, W.; Bracher, F.; Becker, W.: Selectivity profiling and biological activity of novel β -carboline derivatives as potent and selective DYRK1 kinase inhibitors. *PloS one* **2015**, *10*, 1-18.
- [88] Stringer, M.; Abeysekera, I.; Dria, K. J.; Roper, R. J.; Goodlett, C. R.: Low dose EGCG treatment beginning in adolescence does not improve cognitive impairment in a Down syndrome mouse model. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2015**, *138*, 70–79.
- [89] Bain, J.; McLauchlan, H.; Elliott, M.; Cohen, P.: The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* **2003**, *371*, 199–204.
- [90] Kim, H.-S.; Quon, M. J.; Kim, J.-A.: New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 187–195.
- [91] Baell, J.; Walters, M. A.: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature* **2014**, *513*, 481–483.
- [92] Mereles, D.; Hunstein, W.: Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: more pitfalls than promises? *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 5592–5603.
- [93] La Torre, R. de; Sola, S. de; Pons, M.; Duchon, A.; Lagran, M. M. de; Farré, M.; Fitó, M.; Benejam, B.; Langohr, K.; Rodriguez, J.; Pujadas, M.; Bizot, J. C.; Cuenca, A.; Janel, N.; Catuara, S.; Covas, M. I.; Blehaut, H.; Herault, Y.; Delabar, J. M.; Dierssen, M.: Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 278–288.
- [94] Gompel, M.; Leost, M.; Kier Joffe, E. B. de; Puricelli, L.; Franco, L. H.; Palermo, J.; Meijer, L.: Meridianins, a new family of protein kinase inhibitors isolated from the ascidian *Aplidium meridianum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1703–1707.
- [95] Yadav, R. R.; Sharma, S.; Joshi, P.; Wani, A.; Vishwakarma, R. A.; Kumar, A.; Bharate, S. B.: Meridianin derivatives as potent Dyrk1A inhibitors and neuroprotective agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2948–2952.
- [96] Shaw, S. J.; Goff, D. A.; Lin, N.; Singh, R.; Li, W.; McLaughlin, J.; Baltgalvis, K. A.; Payan, D. G.; Kinsella, T. M.: Developing DYRK inhibitors derived from the meridianins as a means of increasing levels of NFAT in the nucleus. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2617–2621.

- [97] Tahtouh, T.; Elkins, J. M.; Filippakopoulos, P.; Soundararajan, M.; Burgy, G.; Durieu, E.; Cochet, C.; Schmid, R. S.; Lo, D. C.; Delhommel, F.; Oberholzer, A. E.; Pearl, L. H.; Carreaux, F.; Bazureau, J.-P.; Knapp, S.; Meijer, L.: Selectivity, cocrystal structures, and neuroprotective properties of leucettines, a family of protein kinase inhibitors derived from the marine sponge alkaloid leucettamine B. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9312–9330.
- [98] Debdab, M.; Carreaux, F.; Renault, S.; Soundararajan, M.; Fedorov, O.; Filippakopoulos, P.; Lozach, O.; Babault, L.; Tahtouh, T.; Baratte, B.; Ogawa, Y.; Hagiwara, M.; Eisenreich, A.; Rauch, U.; Knapp, S.; Meijer, L.; Bazureau, J.-P.: Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B: modulation of alternative pre-RNA splicing. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4172–4186.
- [99] Muraki, M.; Ohkawara, B.; Hosoya, T.; Onogi, H.; Koizumi, J.; Koizumi, T.; Sumi, K.; Yomoda, J.; Murray, M. V.; Kimura, H.; Furuichi, K.; Shibuya, H.; Krainer, A. R.; Suzuki, M.; Hagiwara, M.: Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 24246–24254.
- [100] Ogawa, Y.; Nonaka, Y.; Goto, T.; Ohnishi, E.; Hiramatsu, T.; Kii, I.; Yoshida, M.; Ikura, T.; Onogi, H.; Shibuya, H.; Hosoya, T.; Ito, N.; Hagiwara, M.: Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 86.
- [101] Chaikuad, A.; Diharce, J.; Schröder, M.; Foucourt, A.; Leblond, B.; Casagrande, A.-S.; Désiré, L.; Bonnet, P.; Knapp, S.; Besson, T.: An unusual binding model of the methyl 9-anilinothiazolo[5,4-f]quinazoline-2-carbimides (EHT 1610 and EHT 5372) confers high selectivity for dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10315–10321.
- [102] Foucourt, A.; Hédou, D.; Dubouilh-Benard, C.; Girard, A.; Taverne, T.; Casagrande, A.-S.; Désiré, L.; Leblond, B.; Besson, T.: Design and synthesis of thiazolo[5,4-f]quinazolines as DYRK1A inhibitors, part II. *Molecules* **2014**, *19*, 15411–15439.
- [103] Gourdain, S.; Dairou, J.; Denhez, C.; Bui, L. C.; Rodrigues-Lima, F.; Janel, N.; Delabar, J. M.; Cariou, K.; Dodd, R. H.: Development of DANDYs, new 3,5-diaryl-7-azaindoles demonstrating potent DYRK1A kinase inhibitory activity. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9569–9585.
- [104] Neumann, F.; Gourdain, S.; Albac, C.; Dekker, A. D.; Bui, L. C.; Dairou, J.; Schmitz-Afonso, I.; Hue, N.; Rodrigues-Lima, F.; Delabar, J. M.; Potier, M.-C.; Le Caër, J.-P.; Touboul, D.; Delatour, B.; Cariou, K.; Dodd, R. H.: DYRK1A inhibition and cognitive rescue in a Down syndrome mouse model are induced by new fluoro-DANDY derivatives. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2859.

- [105] Gowda, C.; Sachdev, M.; Muthusami, S.; Kapadia, M.; Petrovic-Dovat, L.; Hartman, M.; Ding, Y.; Song, C.; Payne, J. L.; Tan, B.-H.; Dovat, S.: Casein kinase II (CK2) as a therapeutic target for hematological malignancies. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 95–107.
- [106] Kii, I.; Sumida, Y.; Goto, T.; Sonamoto, R.; Okuno, Y.; Yoshida, S.; Kato-Sumida, T.; Koike, Y.; Abe, M.; Nonaka, Y.; Ikura, T.; Ito, N.; Shibuya, H.; Hosoya, T.; Hagiwara, M.: Selective inhibition of the kinase DYRK1A by targeting its folding process. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11391.
- [107] The UniProt Consortium: UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 158–169.
- [108] Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST. A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402.
- [109] Marchler-Bauer, A.; Bo, Y.; Han, L.; He, J.; Lanczycki, C. J.; Lu, S.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M. K.; Geer, R. C.; Gonzales, N. R.; Gwadz, M.; Hurwitz, D. I.; Lu, F.; Marchler, G. H.; Song, J. S.; Thanki, N.; Wang, Z.; Yamashita, R. A.; Zhang, D.; Zheng, C.; Geer, L. Y.; Bryant, S. H.: CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 200–203.
- [110] Friedman, E.: Mirk/Dyrk1B in cancer. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *102*, 274–279.
- [111] Bullock, A. N.; Das, S.; Debreczeni, J. É.; Rellos, P.; Fedorov, O.; Niesen, F. H.; Guo, K.; Papagrigoriou, E.; Amos, A. L.; Cho, S.; Turk, B. E.; Ghosh, G.; Knapp, S.: Kinase domain insertions define distinct roles of CLK kinases in SR protein phosphorylation. *Structure* **2009**, *17*, 352–362.
- [112] Fourmigué, M.: Coordination chemistry of anions through halogen-bonding interactions. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci., Cryst. Eng. Mater.* **2017**, *73*, 138–139.
- [113] Desiraju, G. R.; Ho, P. S.; Kloo, L.; Legon, A. C.; Marquardt, R.; Metrangolo, P.; Politzer, P.; Resnati, G.; Rissanen, K.: Definition of the halogen bond (IUPAC Recommendations 2013). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 1711–1713.
- [114] Brinck, T.; Murray, J. S.; Politzer, P.: Surface electrostatic potentials of halogenated methanes as indicators of directional intermolecular interactions. *Int. J. Quantum Chem.* **1992**, *44*, 57–64.
- [115] Kolář, M. H.; Hobza, P.: Computer modeling of halogen bonds and other σ -hole interactions. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 5155–5187.
- [116] Batsanov, S. S.: Van der Waals radii of elements. *Inorg. Mater.* **2001**, *37*, 871–885.
- [117] Wilcken, R.; Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Joerger, A. C.; Boeckler, F. M.: Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1363–1388.

- [118] Poznański, J.; Shugar, D.: Halogen bonding at the ATP binding site of protein kinases: Preferred geometry and topology of ligand binding. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834*, 1381–1386.
- [119] Xu, Z.; Yang, Z.; Liu, Y.; Lu, Y.; Chen, K.; Zhu, W.: Halogen bond. Its role beyond drug-target binding affinity for drug discovery and development. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 69–78.
- [120] Moliner, E. de; Brown, N. R.; Johnson, L. N.: Alternative binding modes of an inhibitor to two different kinases. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 3174–3181.
- [121] Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E.: UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
- [122] Lin, F.-Y.; MacKerell, A. D., Jr.: Do halogen-hydrogen bond donor interactions dominate the favorable contribution of halogens to ligand-protein binding? *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 6813–6821.
- [123] Ontoria, J. M.; Rydberg, E. H.; Di Marco, S.; Tomei, L.; Attenni, B.; Malancona, S.; Martin Hernando, J. I.; Gennari, N.; Koch, U.; Narjes, F.; Rowley, M.; Summa, V.; Carroll, S. S.; Olsen, D. B.; De Francesco, R.; Altamura, S.; Migliaccio, G.; Carfi, A.: Identification and biological evaluation of a series of 1*H*-benzo[*de*]isoquinoline-1,3(2*H*)-diones as hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5217–5227.
- [124] Meanwell, N. A.: Improving drug candidates by design: a focus on physicochemical properties as a means of improving compound disposition and safety. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 1420–1456.
- [125] Lipinski C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- [126] Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D.: Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.
- [127] Artursson, P.; Palm, K.; Luthman, K.: Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 27–43.
- [128] Kerns, E. H.; Di, L.; Petusky, S.; Farris, M.; Ley, R.; Jupp, P.: Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1440–1453.
- [129] Saal, C.; Petereit, A. C.: Optimizing solubility: Kinetic versus thermodynamic solubility temptations and risks. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *47*, 589–595.
- [130] Hill, A. P.; Young, R. J.: Getting physical in drug discovery: a contemporary perspective on solubility and hydrophobicity. *Drug Discovery Today* **2010**, *15*, 648–655.

- [131] Hou, T. J.; Xia, K.; Zhang, W.; Xu, X. J.: ADME evaluation in drug discovery. 4. Prediction of aqueous solubility based on atom contribution approach. *J. Chem. Inf. Model.* **2004**, *44*, 266–275.
- [132] Ali, J.; Camilleri, P.; Brown, M. B.; Hutt, A. J.; Kirton, S. B.: *In silico* prediction of aqueous solubility using simple QSPR models: the importance of phenol and phenol-like moieties. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 2950–2957.
- [133] Delaney, J. S.: ESOL: Estimating aqueous solubility directly from molecular structure. *J. Chem. Inf. Model.* **2004**, *44*, 1000–1005.
- [134] Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah V. P.; Crison, J. R.: A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm. Res.*, *12*, 413–420.
- [135] Goyal, R.; Macri, L.; Kohn, J.: Formulation strategy for the delivery of cyclosporine A: comparison of two polymeric nanospheres. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–12.
- [136] Chavda, H. V.; Patel, C. N.; Anand, I. S.: Biopharmaceutics classification system. *Syst. Rev. Pharm.* **2010**, *1*, 62–69.
- [137] Ritchie, T. J.; Macdonald, S. J. F.: The impact of aromatic ring count on compound developability – are too many aromatic rings a liability in drug design? *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 1011–1020.
- [138] Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C.: Escape from flatland: Increasing saturation as an approach to improving clinical success. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6752–6756.
- [139] Viswanadhan, V. N.; Ghose, A. K.; Revankar, G. R.; Robins, R. K.: Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *J. Chem. Inf. Model.* **1989**, *29*, 163–172.
- [140] Jain, N.; Yalkowsky, S. H.: Estimation of the aqueous solubility I: application to organic nonelectrolytes. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 234–252.
- [141] Hopkins, A. L.; Keserü, G. M.; Leeson, P. D.; Rees, D. C.; Reynolds, C. H.: The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, *13*, 105–121.
- [142] MarvinSketch, 18.10.0, **2018**, ChemAxon. Online erhältlich: <http://www.chemaxon.com> (abgerufen am 27.08.2018).
- [143] Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V.: SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717.
- [144] Meine, R.; Becker, W.; Falke, H.; Preu, L.; Loaëc, N.; Meijer, L.; Kunick, C.: Indole-3-carbonitriles as DYRK1A inhibitors by fragment-based drug design. *Molecules* **2018**, *23*, 64.

- [145] Falke, H.: Neue selektive Hemmstoffe der Proteinkinase DYRK1A. Dissertation Technische Universität Braunschweig, Shaker Verlag Aachen, **2013**, S. 169f.
- [146] Agwuh, K. N.; MacGowan, A.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylcyclines. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 256–265.
- [147] Janzen, W. P.: Screening technologies for small molecule discovery. The state of the art. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1162–1170.
- [148] Pagadala, N. S.; Syed, K.; Tuszynski, J.: Software for molecular docking: a review. *Biophys. Rev.* **2017**, *9*, 91–102.
- [149] Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R.: Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.
- [150] Wu, F.; Xu, T.; He, G.; Ouyang, L.; Han, B.; Peng, C.; Song, X.; Xiang, M.: Discovery of novel focal adhesion kinase inhibitors using a hybrid protocol of virtual screening approach based on multicomplex-based pharmacophore and molecular docking. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 15668–15678.
- [151] Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D.: Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2003**, *52*, 609–623.
- [152] S. Knapp; A. Chaikuad: Persönliche Mitteilung vom 04.05.2018 übermittelt durch Conrad Kunick.
- [153] Czarna, A.; Wang, J.; Zelencova, D.; Liu, Y.; Deng, X.; Choi, H. G.; Zhang, T.; Zhou, W.; Chang, J. W.; Kildalsen, H.; Seternes, O. M.; Gray, N. S.; Engh, R. A.; Rothweiler, U.: Novel scaffolds for dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase (DYRK1A) inhibitors. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 7560–7572.
- [154] *Molecular Operating Environment (MOE)*. Chemical Computing Group ULC, 010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2019**.
- [155] Smirlis, D.: *Leishmania infantum DYRK1: a negative regulator of the G1 to S cell-cycle transition, essential for the development of infective stationary phase promastigotes*, St. Malo, Konferenz "DYRK1A, related kinases and human disease" Session: 11, DYRKs substrates & regulators, **31.03.2017**.
- [156] Sali, A.; Blundell, T. L.: Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 779–815.
- [157] Shen, M.-Y.; Sali, A.: Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci.* **2006**, *15*, 2507–2524.
- [158] Yedukondalu, M.; Sridhar, R.; Basaveswara Rao, M. V.: Novel method for synthesis of substituted tetrahydrocarbazoles using aqueous sulphuric acid. *Pharma Chem.* **2013**, *5*, 343–349.
- [159] Yamane, K.; Fujimori, K.: A convenient synthesis of indolotropones and 6-substituted 5-azabenz[b]azulenes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 1101–1104.

- [160] Li, X.; Vince, R.: Conformationally restrained carbazolone-containing α,γ -diketo acids as inhibitors of HIV integrase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2942–2955.
- [161] Littell, R.; Greenblatt, E. N.; Allen, G. R., Jr.: Mannich bases of 2,3-dihydro-4(1*H*)-carbazolones as potential psychotropic agents. *J. Org. Chem.* **1972**, *15*, 875–876.
- [162] Horstmann, P.; Unterhalt, B.: Aminoalcohols related to tramadol (tramal®). *Arch. Pharm.* **1997**, *330*, 362–364.
- [163] Taro Pharmaceutical Industries Ltd.: Process for preparing 1,2,3,9-tetrahydro-9-methyl-3-methylene-4*H*-carbazol-4-one and ondansetron therefrom. Erfinder: Daniella Gutman und Rosa Cyjon: 13.04.2010. Vereinigte Staaten. US7696356B2.
- [164] Kim, M. Y.; Lim, G. J.; Lim, J. I.; Kim, D. S.; Kim, I. Y.; Yang, J. S.: An efficient process of ondansetron synthesis. *Heterocycles* **1997**, *45*, 2041–2043.
- [165] Vale, J. A.; Zanchetta, D. F.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.: Efficient α -methylenation of carbonyl compounds in ionic liquids at room temperature. *Synlett* **2008**, *2009*, 75–78.
- [166] Jennings, S.: Ondansetron-analoge 5-HT₃-Rezeptorliganden: Synthese, Stereochemie und *in-vitro*-Pharmakologie. Dissertation Universität Regensburg, **2008**, S. 160–247.
- [167] Glaxo Group LTD: 3-Imidazolylmethyl-1,2,3,9-tetrahydro-4*H*-carbazol-4-one derivatives. Erfinder: Ian Harold Coates, James Angus Bell, David Cedric Humber und George Blanch Ewan: 14.08.1985. Vereinigtes Königreich. DE-3502508-A1.
- [168] Gu, Z.-M.; Ma, J.; Zhao, X.-G.; Wu, J.; Zhang, D.: Reduction of nitriles to amines in positive ion electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2969–2972.
- [169] Schug, K.; McNair, H. M.: Adduct formation in electrospray ionization. Part 1: Common acidic pharmaceuticals. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 760–766.
- [170] Ando, S.; Ando, I.; Shoji, A.; Ozaki, T.: Intermolecular hydrogen-bonding effect on ¹³C NMR chemical shifts of glycine residue carbonyl carbons of peptides in the solid state. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3380–3386.
- [171] Giordanetto, F.; Tyrchan, C.; Ulander, J.: Intramolecular hydrogen bond expectations in medicinal chemistry. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 139–142.
- [172] Riniker, S.; Barandun, L. J.; Diederich, F.; Krämer, O.; Steffen, A.; van Gunsteren, W. F.: Free enthalpies of replacing water molecules in protein binding pockets. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, *26*, 1293–1309.
- [173] Podjarny, A.; Dejaegere, A. P.; Kieffer, B.: *Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2011**, S. 86–90.
- [174] Gopal, S. M.; Klumpers, F.; Herrmann, C.; Schäfer, L. V.: Solvent effects on ligand binding to a serine protease. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 10753–10766.

- [175] Kumar, V.; Bharate, S. B.; Vishwakarma, R. A.; Bharate, S. S.: Selection of a water-soluble salt form of a preclinical candidate, IIM-290: multiwell-plate salt screening and characterization. *ACS Omega* **2018**, *3*, 8365–8377.
- [176] Miyazaki, S.; Nakano, M.; Arita, T.: A comparison of solubility characteristics of free bases and hydrochloride salts of tetracycline antibiotics in hydrochloric acid solutions. *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 1197–1204.
- [177] Serajuddin, A. T. M.: Salt formation to improve drug solubility. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 603–616.
- [178] Avdeef, A.: Suggested improvements for measurement of equilibrium solubility-pH of ionizable drugs. *ADMET and DMPK* **2015**, *3*, 84–109.
- [179] He, Y.; Ho, C.; Yang, D.; Chen, J.; Orton, E.: Measurement and accurate interpretation of the solubility of pharmaceutical salts. *J. Pharm. Sci* **2017**, *106*, 1190–1196.
- [180] Apley, M.; Crist, B.; Fellner, V.; Gonzalez, M. A.; Hunter, R. P.; Martinez, M. N.; Messenheimer, J. R.; Modric, S.; Papich, M. G.; Parr, A. F.; Riviere, J. E.; Marques, M. R. C.: Determination of thermodynamic solubility of active pharmaceutical ingredients for veterinary species: a new USP general chapter. *Dissolution Technol.* **2017**, *24*, 36–39.
- [181] Levis, K. A.; Lane, M. E.; Corrigan, O. I.: Effect of buffer media composition on the solubility and effective permeability coefficient of ibuprofen. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* **2003**, *253*, 49–59.
- [182] Wölfel, S.: Neue Inhibitoren der *anaplastic lymphoma kinase*. Dissertation Technische Universität Braunschweig, Shaker Verlag Aachen, **2014**.
- [183] Huang, L.-F.; Tong, W.-Q.: Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 321–334.
- [184] O'Neil, M. J.: *The Merck index*. Merck, Whitehouse Station, NJ, **2013**. 14. Auflage, S. 1270.
- [185] Nagaraj, R.; Sharpley, M. S.; Chi, F.; Braas, D.; Zhou, Y.; Kim, R.; Clark, A. T.; Banerjee, U.: Nuclear localization of mitochondrial TCA cycle enzymes as a critical step in mammalian zygotic genome activation. *Cell* **2017**, *168*, 210–223.
- [186] Klopman, G.; Li, J.-Y.; Wang, S.; Dimayuga, M.: Computer automated log *P* calculations based on an extended group contribution approach. *J. Chem. Inf. Model.* **1994**, *34*, 752–781.
- [187] Csizmadia, F.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Panderi, I.; Darvas, F.: Prediction of distribution coefficient from structure. 1. Estimation method. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 865–871.
- [188] Bloch, D.: Review of PHYSPROP Database (Version 1.0). *J. Chem. Inf. Model.* **1995**, *35*, 328–329.

Danksagung

Ich möchte mich zuerst an meinen Mentor Prof. Dr. Conrad Kunick richten, dem ich einen herzlichen Dank für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und stetige Unterstützung sowie die Überlassung des Forschungsthemas aussprechen möchte. Die Familiarität und Harmonie im Arbeitskreis werden mir in steter Erinnerung bleiben.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Hermann Wätzig für die Übernahme des Koreferats und bei Prof. Dr. Scherneck für die Leitung der Prüfungskommission bedanken.

Ein Dank für die Durchführung der kinaseinhibitorischen Testungen geht an Prof. Dr. Laurent Meijer und die Mitarbeiter von ManRos Therapeutics in Roscoff, Frankreich.

Für die Aufnahme und Bereitstellung der NMR-Spektren möchte ich mich außerdem bei Dr. Kerstin Ibrom, Petra Holba Schulz und Gabrielle Krafft vom Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig bedanken. Der Dank gilt ebenfalls für Dr. Ulrich Papke und Cornelia Mlynek vom Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig für die Durchführung und Auswertung vieler massenspektrometrischer Experimente.

Für die Aufnahme der IR-Spektren, Probenvorbereitung der NMR-Experimente, die Durchführung der Elementaranalysen und die Einwaagen für die biologischen Testungen und Löslichkeitsmessungen möchte ich mich bei Sandra Meyer und Petra Reich von der analytischen Abteilung des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie bedanken. Für die Versorgung mit Chemikalien und Glasgeräten danke ich Matthias Söchtig und Klaus Hartmann. Außerdem danke ich Frank Roese und Eduard Hinz, die mich bei technischen und handwerklichen Problemstellung stets unterstützten. Für die Bewältigung von IT-Problemen danke ich Robert Hübner. Britta Thomas, Daniela Eberle und Thomas Hoffmann danke ich für die organisatorische Unterstützung.

Ein besonders herzlicher Dank gilt Dr. Lutz Preu für die Unterstützung in vielerlei analytischen Fragestellungen und Auswertung der NMR-Spektren sowie der Betreuung während der Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik.

Für die schöne Zeit am Institut, für ein freundschaftliches Miteinander, für tolle Gespräche und leckere Frühstücksrunden möchte ich allen Mitarbeiter des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie bedanken. Ich möchte mich besonders bei aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Dr. Anne Meyer, Dr. Hoang Lande, Dr. Laura Schlütke, Dr. Andreas Masch, Dr. Thomas Weidner, Dr. Oliver Orban, Markus Immer, Dr. Rosanna Meine, Mehmet Karatas, Merle Nöhre, Irina Ihnatenko, Marco Müller, Maren Flaßhoff und Sandra Schweda für die fachliche Unterstützung sowie für die tolle und spaßige Zeit bedanken.

Für die Unterstützung im Rahmen des Wahlpflichtfaches danke ich Janosch Baumgarten, Irene Bunten, Leona Lünswilken, Carolin Oppermann und Carina von Malottki.

Ich danke außerdem Moritz Rehbein vom Institut für Chemische und Thermische Verfahrenstechnik für einen regen Austausch und viele Kooperationen abseits dieser Arbeit.

Für das Korrekturlesen möchte ich mich besonders herzlich bei Irina Ihnatenko, Marco Müller, Maren Flaßhoff, Mehmet Karatas und Sandra Schweda bedanken. Danke für eure Hilfe und kompetenten Verbesserungsvorschläge.

Am Ende möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion bedanken. Anne danke ich besonders für die Unterstützung, die Geduld und die köstliche kulinarische Versorgung während der arbeitsintensiven Zeit und in allen Lebenslagen.